

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA – UNIR
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ NOROESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MESTRADO E DOUTORADO EM
BIOLOGIA EXPERIMENTAL - PGBIOEXP

KÁTIA PAULA FELIPIN

BUSCA DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE MUCOSA
EM ESCALA GENÔMICA UTILIZANDO MICROARRANJOS DE DNA

PORTO VELHO/RO
2017

KÁTIA PAULA FELIPIN

**BUSCA DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE MUCOSA
EM ESCALA GENÔMICA UTILIZANDO MICROARRANJOS DE DNA**

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, do Núcleo de Saúde, da Universidade Federal de Rondônia – UNIR, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Experimental.

Orientador: Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

**PORTO VELHO/RO
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Fundação Universidade Federal de Rondônia

Gerada automaticamente mediante informações fornecidas pelo (a) autor (a)

576 Felipin, Kátia Paula.

Busca de fatores genéticos associados à leishmaniose mucosa em escala genômica utilizando microarranjos de DNA / Kátia Paula Felipin. -- Porto Velho, RO, 2017.

72 f. : il.

Orientador(a): Prof. Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) - Fundação Universidade Federal de Rondônia

1. Leishmaniose tegumentar mucosa. 2. Human Mapping 250K Nsp Array. 3. SNP. 4. Estudo de associação em escala genômica. I. Ferreira, Ricardo de Godoi Mattos. II. Título.

CDU F315b

KÁTIA PAULA FELIPIN

**BUSCA DE FATORES GENÉTICOS ASSOCIADOS À LEISHMANIOSE MUCOSA
EM ESCALA GENÔMICA UTILIZANDO MICROARRANJOS DE DNA**

Defesa da dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Stricto Sensu Mestrado e Doutorado em Biologia Experimental – PGBIOEXP – do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de mestre, em sessão pública realizada em 03 de maio de 2017.

Banca Examinadora

1) Prof. Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira - FIOCRUZ RONDÔNIA – Porto Velho/RO

Assinatura: _____

2) Prof. Dr. Jansen Fernandes de Medeiros – FIOCRUZ RONDÔNIA – Porto Velho/RO

Assinatura: _____

3) Prof. Dra. Rubiani de Cássia Pagotto – Universidade Federal de Rondônia – Porto Velho/RO

Assinatura: _____

“O importante é não deixar de fazer perguntas.”

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

*A minha família por todo
amor e incentivo em minha
formação. Amo vocês!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar e dar forças nessa jornada.

Ao meu orientador, Dr. Ricardo de Godoi Mattos Ferreira pelo apoio, oportunidade de crescimento, confiança e conhecimentos compartilhados ao longo do meu período no laboratório.

Ao Dr. Gabriel Ferreira pela paciência, infinita disponibilidade e ensinamentos ao longo das correções do trabalho.

Ao Dr. Henrique Krieger, pelas discussões do trabalho junto ao meu orientador e, pela disponibilidade da plataforma técnica e insumos para o desenvolvimento da metodologia.

A Fiocruz Rondônia pela oportunidade de desenvolver parte desse trabalho em seu estabelecimento.

Ao Laboratório de Epidemiologia Genética por ceder às amostras de DNA.

Aos colegas do Laboratório de Epidemiologia Genética, Ms. Lilian, Ms. Iasmin, Ms. Cristiane, Ms. Márlon, Ms. Andonai, Claudino, Hélen, Flavinha e Yoda pelo suporte e apoio durante o desenvolvimento dessa pesquisa e, pela convivência diária, tornando os meus dias mais leves.

A UNIR por ceder o Laboratório de Genética Humana para o desenvolvimento dos ensaios de microarranjos.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental pela oportunidade de desenvolver o mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental que contribuíram para a minha formação.

A CAPES e FAPERO pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu esposo Walceir, pela paciência, dedicação e incentivo nas minhas decisões.

Aos meus pais Aldeni e Paulo, ao meu irmão Ricardo, e minha tia Silva por todo amor, carinho e suporte. Vocês são minha base.

Aos amigos Eliseu e Silvânia pela amizade e incentivo nos momentos difíceis.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, sendo considerada uma doença de difícil entendimento, podendo gerar uma diversidade de aspectos clínicos. A distribuição dessa doença a tornou um problema de saúde pública mundial afetando diversos países. A leishmaniose tegumentar tem amplo espectro clínico variando de lesões de pele, únicas ou múltiplas, localizadas principalmente em áreas descobertas do corpo, à lesões mucosas, que são consideradas uma evolução clínica da doença a partir das lesões cutâneas. Os fatores que contribuem para o agravamento da lesão cutânea inicial parecem dependentes da espécie do parasita envolvida e de fatores genéticos e imunológicos do hospedeiro. O presente trabalho propôs avaliar aspectos genéticos do hospedeiro associados ao fenótipo clínico da leishmaniose mucosa, pela busca de polimorfismos (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) que possam estar relacionados com o agravamento da doença, utilizando uma plataforma robusta, com capacidade de analisar simultaneamente 262 mil sítios distribuídos por todo o genoma humano. O estudo é do tipo caso – controle, com um grupo de 30 amostras de pacientes com lesão mucosa (caso) e um grupo com 29 amostras de pacientes com lesão cutânea (controle). Foi realizada a leitura de 69 chips e, 59 chips foram considerados aptos para prosseguir com a análise tendo como base as métricas QC. Desses, 30 chips foram de amostras provenientes de pacientes com lesão mucosa e, 29 chips de amostras provenientes de pacientes com lesão cutânea. Os testes de associação entre os SNPs e os fenótipos foram realizados utilizando o pacote PLINK. Para observar os resultados de maneira global, foi utilizado o gráfico de *Manhattan Plot*. Na análise utilizando a abordagem GWAS não foram observadas associações significantes considerando nível de significância determinado pela aplicação da correção de Bonferroni. Considerando que a correção de Bonferroni é reconhecidamente conservadora, foram analisados os 15 SNPs com maior indicação de associação com o fenótipo abordado. Desses, foi possível listar três possíveis genes candidatos relacionados com a evolução da leishmaniose tegumentar (C20orf85, GRM8 e PCLO). No cromossomo 4, foram identificados três SNPs em posições bem próximas e, numa região adjacente a esses foram descritos quatro genes relacionados com a resposta imune em infecções pelo parasito *Leishmania*, tornando esses polimorfismos sugestões para trabalhos futuros.

Palavras – chave: Leishmaniose tegumentar mucosa, *Human Mapping 250K Nsp Array*, SNP, Estudo de associação em escala genômica.

ABSTRACT

Tegumentary Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*, being considered difficult understanding disease that can generate a diversity of clinical aspects. Its distribution has made it a global public health problem affecting several countries. Tegumentary Leishmaniasis has a broad clinical spectrum ranging from single or multiple skin lesions, mainly located in areas uncovered of the body, to mucosal lesions, which are considered a clinical evolution from cutaneous lesions. The factors that contribute to the aggravation of the initial cutaneous lesion seem to depend on the species of the parasite involved and the genetic and immunological factors of the host. The present work proposed to evaluate genetic aspects of the host associated with the clinical phenotype of mucosal leishmaniasis, by the search for polymorphisms (Single Nucleotide Polymorphism (SNP) that may be related to the aggravation of the disease, using a robust platform, with the capacity to simultaneously analyze 262 thousand sites distributed throughout the human genome. The search is a case-control study, with a group of 30 samples of patients with mucosal lesion (case group) and a group with 29 samples of patients with cutaneous lesions (control group). It was performed the reading of 69 chips and 59 chips were considered apt to proceed with the analysis based on the QC metrics. Of these, 30 chips were from samples from patients with mucosal lesion and 29 from samples from patients with cutaneous lesions. The association tests between SNPs and phenotypes were performed using the PLINK package. To look at the results in a global way, the Manhattan Plot was used. In analysis using the GWAS approach, no significant associations were observed since the level of significance determined by the application of the Bonferroni correction. Considering that the Bonferroni correction is admittedly conservative, the 15 SNPs with the highest indication of association with the phenotype were analyzed. Of these, it was listed three possible candidate genes related to Tegumentary Leishmaniasis evolution (C20orf85, GRM8 and PCLO). On chromosome 4, three SNPs were identified in very close positions and, in an adjacent region, four genes related to the immune response in infections by the *Leishmania* parasite were described, making these regions suggestive for future research.

Key-words: Mucosal tegumentary leishmaniasis, Human Mapping 250K Nsp Array, SNP, Association study on genomic scale.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar nas Américas. _____	12
Figura 2 – Formas evolutivas do parasito <i>Leishmania</i> . _____	13
Figura 3 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> . _____	15
Figura 4 – Vetor e reservatórios de Leishmaniose Tegumentar. _____	16
Figura 5 – Principais formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar. _____	17
Figura 6 – Exemplo de SNPs e de haplótipos _____	23
Figura 7 – Ensaio de mapeamento Gene Chip Nsp I. _____	31
Figura 8 – Gel de agarose a 2% para checagem da PCR. _____	32
Figura 9 – Gel de agarose a 4% para checagem da Fragmentação. _____	34
Figura 10 – Imagens geradas no escaneamento do chip. _____	40
Figura 11 – Dados de GWAS mostrando valores de Probabilidade (<i>Manhattan Plot</i>). _____	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações do GWAS. _____	44
Tabela 2 – Valor do Controle de Qualidade – <i>QC call rate</i> e <i>call rate</i> das amostras geradas pelo GTC da Affymetrix e identificação do tipo de amostra. _____	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Número de casos notificados de Leishmaniose Tegumentar por estado da Região Norte no período de 2001 a 2015. _____	12
Gráfico 2 – Valores de QC <i>call rate</i> e <i>call rate</i> das amostras. _____	41
Gráfico 3 – SNP com probabilidade de associação. _____	68
Gráfico 4 – SNP sem probabilidade de associação. _____	68

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos Epidemiológicos	11
1.1.1 Distribuição	11
1.1.2 Os Agentes Etiológicos	13
1.1.3 Ciclo Biológico.....	14
1.1.4 Vetores e Reservatórios	15
1.2 Aspectos Clínicos	16
1.2.1 Lesões Cutâneas	16
1.2.2 Lesões Mucosas	17
1.3 Diagnóstico.....	18
1.3.1 Diagnóstico Clínico.....	18
1.3.2 Diagnóstico Laboratorial.....	18
1.4 Tratamento.....	19
1.5 Evolução da doença	20
1.6 Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP).....	22
1.6.1 Associação de SNP a um fenótipo	24
1.7 Microarranjos	25
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo Geral	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3 METODOLOGIA.....	29
3.1 Aspectos Éticos	29
3.2 Casuística.....	29
3.3 Amostras	29
3.4 <i>GenomiPhi V2 Amplification Kit</i>	30
3.5 Genotipagem das Amostras	30
3.5.1 Digestão do DNA Genômico.....	31
3.5.2 Ligação ao adaptador e diluição da amostra.....	31
3.5.3 PCR.....	32
3.5.4 Purificação	33
3.5.5 Fragmentação.....	33
3.5.6 Marcação	34
3.5.7 Hibridação	34
3.5.8 Lavagens, Coloração e Leitura	35

3.5.9 Coleta e Análise dos dados de Microarranjos de DNA	36
3.6 PLINK e gPLINK	36
3.7 Haploview	37
3.8 <i>Integrative Genomics Viewer</i> (IGV)	38
3.9 Correção de Bonferroni	38
4 RESULTADOS	40
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS	51
ANEXO A	62
APÊNDICE A	66
APÊNDICE B	68

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa que está presente em 98 países (ALVAR et al., 2012), ocorrendo aproximadamente de 0,7 a 1,3 milhões de casos por ano em todo o mundo. Cerca de 90% desses casos estão concentrados Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2017). Essa doença tornou-se um problema de saúde pública mundial devido sua ampla distribuição geográfica e por originar formas clínicas que podem causar incapacidade e mutilações (OPAS; WHO, 2016).

A LT é considerada uma zoonose que afeta durante o seu ciclo animais silvestres, domésticos e acidentalmente o homem. A doença é causada por protozoários parasitas pertencentes à classe Kinetoplastida, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (LAINSON, 2010), que são transmitidos aos seres humanos durante o repasto sanguíneo por flebotomíneos infectados, podendo gerar uma diversidade de aspectos clínicos que parecem ser dependentes principalmente da espécie envolvida (MARTINS; LIMA, 2013).

1.1 Aspectos Epidemiológicos

1.1.1 Distribuição

Nas Américas, as leishmanioses cutâneas (LC) e mucosas (LM) são endêmicas em 18 países. Os casos humanos da doença encontram-se distribuídos desde o México à Argentina. No Brasil, estão concentrados 78,8 % do total de casos de LC e LM (47.492) registrados no Sistema Regional de Informações de Leishmanioses da OPS/OMS (SisLeish) em 2013 nos países das Américas com exceção da Venezuela e Guiana Francesa (OPAS; WHO, 2016).

No Brasil, na década de 1980, essa doença foi registrada em 19 unidades federadas e em 2003 foi confirmada autoctonia em todos os estados brasileiros. Na Figura 1 podemos observar a epidemiologia da LT nas Américas (BRASIL, 2010).

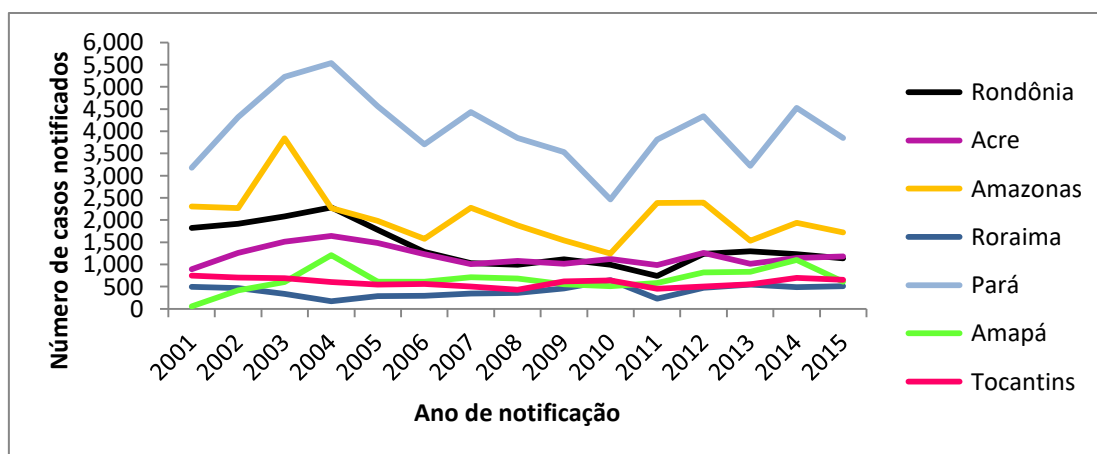
Na região Norte do Brasil tem sido registrado o maior número de casos (9.668), com coeficiente de detecção de 60,2 por 100.000 habitantes (Gráfico 1) (BRASIL, 2017). Em 2004, a LT havia sido registrada em todos os municípios do estado de Rondônia, acometendo em sua maioria pacientes do sexo masculino, em todas as faixas etárias, a maioria tem entre 20 e 40 anos, sendo a LC forma clínica predominante (BRASIL, 2014).

Figura 1 – Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar nas Américas.



Legenda: A figura representa a epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar nas Américas, identificando a endemicidade por cores. Fonte: WHO, 2016.

Gráfico 1 – Número de casos notificados de Leishmaniose Tegumentar por estado da Região Norte no período de 2001 a 2015.



Legenda: O gráfico representa o número de casos notificados de Leishmaniose Tegumentar nos Estados Rondônia, Acre, Amazonas, Roraima, Pará, Amapá e Tocantins no período de 2001 a 2015. Fonte: BRASIL, 2017.

Em Rondônia, são notificados cerca de 1000 novos casos ao ano, com coeficiente de detecção de 68,29 por 100.000 habitantes, desses, aproximadamente 12% são referentes a

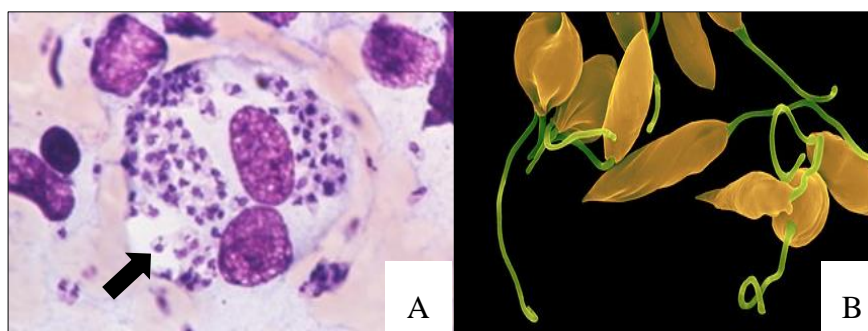
casos de lesão mucosa (BRASIL, 2014), índice superior à média nacional, onde cerca de 5% dos pacientes evoluem para forma mucosa. O alto índice de detecção e número de casos se deve principalmente a algumas particularidades encontradas na região amazônica, como ambiente propício ao desenvolvimento dos vetores, alta exposição do homem à infecção além da abundante fauna flebotômica e da variedade de espécies do parasita. As causas envolvidas na evolução da doença são multifatoriais, parecem ser dependentes principalmente da espécie do parasita, do estado imunológico e de fatores genéticos do hospedeiro (BRASIL, 2010).

1.1.2 Os Agentes Etiológicos

O gênero *Leishmania* é dividido em dois subgêneros de acordo com o local de desenvolvimento da forma promastigota no inseto vetor: *Leishmania* (*Leishmania*) e *Leishmania* (*Viannia*) (LAINSON, 2010). As *Leishmanias* são parasitas de células do sistema fagocítico monocitário em hospedeiros vertebrados (HERWALDT, 1999; BRASIL, 2010), é capaz de infectar diferentes espécies de mamíferos e vetores (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

Duas formas evolutivas principais caracterizam o gênero *Leishmania*: amastigota e promastigota (Figura 2). A forma amastigota é encontrada em vertebrados, não possui mobilidade e habita nos vacúolos digestivos (fagolisossomos) dos macrófagos que os fagocitam. A forma promastigota é a forma alongada e móvel, se desenvolve no tubo digestivo dos vetores ou em meios de cultura (LESSA et al., 2007). A forma amastigota possui de 2-4 μm de diâmetro e a forma promastigota 15-20 μm x 1,5-3,5 μm , com flagelo 15-28 μm (HERWALDT, 1999).

Figura 2 – Formas evolutivas do parasito *Leishmania*.



Legenda: Formas amastigotas (seta preta) no interior de macrófagos (A) e formas promastigotas (B).
 Fonte: SINCLAIR Stammers / Science Photo Library (A) e DENNIS Kunkel MICROSCOPY / Science Photo Library (B), 2016.

Existem 30 espécies de *Leishmania*, dessas, estima-se que 22 sejam patogênicas ao homem (OPAS; WHO, 2016). Esses protozoários estão abundantemente distribuído em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (CUPOLILLO et al., 2000). No Brasil, as principais espécies causadoras de LT são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (BRASIL, 2010).

Na região Amazônica as espécies de *Leishmania* responsáveis pelos casos de LT são seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*, sendo descritas algumas características dessas espécies a seguir (SILVEIRA et al., 2002; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003):

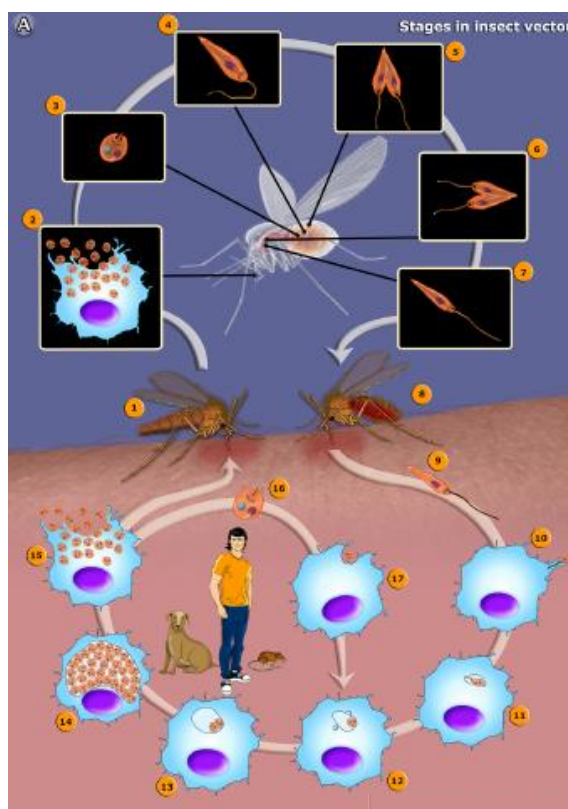
- A espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* está relacionada com a infecção cutânea e com a forma clínica de longa evolução, causando acometimento de mucosas (VERGEL et al., 2006). Foi à primeira espécie descrita e incriminada como causadora da LT (LAINSON, 2010) sendo considerada a mais prevalente em toda a América Latina (BRASIL, 2007);
- *Leishmania (Viannia) guyanensis* pode causar lesões únicas ou disseminadas na pele (COUPPIÉ et al., 2004);
- O parasito *Leishmania (Viannia) naiffi* causa LT de evolução benigna, sendo característica da manifestação clínica causada nas infecções por essa espécie, a lesão cutânea única (DARIE et al., 1995; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003);
- Infecção por *Leishmania (Viannia) shawi* causa lesão única, todavia pode ocorrer eventualmente metástase e ser observado casos de múltiplas lesões (LAINSON; SHAW, 1989; LAINSON, 2010);
- *Leishmania (Viannia) lainsoni* causa lesão cutânea única que se apresenta na forma de pequenas úlceras ou nódulos (SILVEIRA et al., 1989; CORRÊA; BRAZIL; SOARES, 2005);
- Os parasitos da espécie *Leishmania (Viannia) lindenbergi* causam lesão cutânea simples (SILVEIRA et al., 2002);
- A infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é definida pela presença de lesão ulcerada, sendo na maioria das vezes única, porém, pode desenvolver o quadro clássico de leishmaniose cutânea anérgica difusa (LD), envolvendo extensas áreas cutâneas com pápulas (SILVEIRA et al., 2008).

1.1.3 Ciclo Biológico

O ciclo de biológico de *Leishmania* sp envolve hospedeiros vertebrados e invertebrados (TEIXEIRA et al., 2013). As formas promastigotas são inoculadas junto aos componentes salivares durante o repasto sanguíneo pelo flebotomíneo infectado. Essas formas

são fagocitadas pelas células do sistema fagocítico monocitário (principalmente macrófagos) que habita num vacúolo parasitóforo. Nesse vacúolo as promastigotas transformam-se em amastigotas, que irão replicar por divisão binária, e no rompimento da célula hospedeira são liberadas novas formas amastigotas permitindo a reinfecção dos fagócitos locais (Figura 3) (SILVEIRA et al., 2008).

Figura 3 – Ciclo de vida da *Leishmania*.



Legenda: Os estágios um ao sete evidenciam as fases de desenvolvimento do parasito no inseto vetor e, do estágio oito ao dezesseis, as fases de desenvolvimento no hospedeiro vertebrado. Fonte: Adaptado de Teixeira et al., 2013.

O ciclo de transmissão se completa quando os fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante a hematofagia e as formas amastigotas, posteriormente, se convertem em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo (KAYE; SCOTT, 2011).

1.1.4 Vetores e Reservatórios

Os insetos vetores da LT são fêmeas hematófagas de diversas espécies de flebotomíneos, da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae (Figura 4 A). No velho mundo as espécies pertencem ao gênero *Phlebotomus* e, no novo mundo, ao gênero *Lutzomyia* (DESJEUX, 1996; BRASIL, 2010). Dependendo da localização geográfica é chamado popularmente de birigui, mosquito palha, tatuquira, entre outros (BRASIL, 2010).

Todas as espécies de animais que garantam a circulação da *Leishmania* dentro de um determinado tempo e espaço são consideradas reservatórios de LT (Figura 4 B,C). Infecções por *Leishmania* já foram descritas em várias espécies de animais silvestres, sinantrópicos e domésticos, como felídeos, canídeos e equídeos. Marsupiais, roedores, edentados e canídeos silvestres foram registrados como prováveis reservatórios naturais (BRASIL, 2007). O papel desempenhado por cada reservatório irá depender das espécies de *Leishmania* envolvidas (CABRERA et al., 2003).

Figura 4 – Vetor e reservatórios de Leishmaniose Tegumentar.



Legenda: Fêmea de flebotomíneo ingurgitada (A), Roedor *Bolomys lasiurus* (B) e, gato com lesão de focinho (C). Fonte: BRASIL, 2007.

1.2 Aspectos Clínicos

As manifestações clínicas da LT dependem da espécie de *Leishmania* envolvida e do sistema imunológico do hospedeiro, gerando uma diversidade de formas clínicas que variam de lesões cutâneas a mucosas (Figura 5) (PIRES et al., 2012).

1.2.1 Lesões Cutâneas

A forma cutânea é caracterizada por apresentar úlceras de pele localizadas principalmente em áreas expostas do corpo, como por exemplo, na face, braços e pernas, (WHO, 2016) sendo as lesões especificamente cutâneas e, com tendência a cicatrização (BRASIL, 2010). O prenúncio da infecção é um eritema pequeno que é desenvolvido depois de um período pré-patente onde o flebotomíneo infectado picou. Em seguida, o eritema desenvolve-se em uma pápula e após, em um nódulo que ulcera gradativamente em um período de duas semanas a seis meses (REITHINGER et al., 2007). Em relação à forma da lesão instalada, é uma úlcera arredondada, indolor, com uma crosta central podendo ser hemorrágica, sendo delimitada por uma borda elevada (GOTO; LINDOSO, 2010).

A forma cutânea localizada é a prevalente e, as lesões podem variar em quantidade, dependendo do número de picadas. Quando a lesão cura espontaneamente forma uma cicatriz hipopigmentada, fina e lisa. Dependendo da relação parasito - hospedeiro, alguns casos podem evoluir para outras formas da patologia (LESSA et al., 2007).

A leishmaniose cutânea difusa produz múltiplas lesões que podem se cronificar com o tempo, sendo de difícil tratamento (WHO, 2016). É considerada uma manifestação rara de leishmaniose caracterizada por apresentar lesões nodulares e placas não ulceradas que podem estar em diversas partes do corpo do indivíduo, sendo ricas em parasitas. Admite – se que a forma difusa é resultado da não resposta imunológica mediada por células, havendo um crescimento parasitário desenfreado (BARRAL et al., 1995; BARRAL; BARRAL-NETTO, 2009; PIRES et al., 2012).

A leishmaniose disseminada é caracterizada pela presença de múltiplas lesões, variando geralmente de 10 a 300 lesões pleomórficas, sendo predominantemente acneiformes e papulares, ocorrendo em duas ou mais regiões diferentes do corpo (GOTO; LINDOSO, 2010).

1.2.2 Lesões Mucosas

A forma mucosa ocorre através da disseminação via linfática ou hematogênica das *Leishmanias sp.* da lesão cutânea para a mucosa. Em geral, a LM aparece depois de meses ou anos após a cura clínica da lesão cutânea. Os pacientes que apresentam maiores riscos para o desenvolvimento da metástase são os que possuem múltiplas lesões, lesões extensas e com mais de um ano de evolução ou, lesões acima da cintura pélvica (BRASIL, 2007).

A forma mucosa, conhecida como mucocutânea, acomete de forma parcial ou total as mucosas do nariz, boca e garganta, podendo atingir os tecidos circundantes (DAVID; CRAFT, 2009), porém, a doença se instala preferencialmente na mucosa do septo nasal cartilagenoso. Os sintomas iniciais são brandos, ocorrendo inflamação e congestão nasal, podendo evoluir de forma gradativa para ulceração e perfuração do septo nasal. A lesão mucosa pode ser acompanhada por uma lesão cutânea. (LESSA et al., 2007).

Figura 5 – Principais formas clínicas de Leishmaniose Tegumentar.



Legenda: Lesão cutânea típica (A), Lesão cutânea difusa (B), Lesão cutânea disseminada (C) e, Lesão mucosa com acometimento da cartilagem nasal (D). Fonte: Arquivo Laboratório de Epidemiologia Genética (A, B e C) e, Calvopina et al., 2006 (D).

1.3 Diagnóstico

O diagnóstico da LT envolve os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, sendo frequente a necessidade de associar esses elementos para chegar ao diagnóstico final (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; ESPIR et al., 2016).

1.3.1 Diagnóstico Clínico

O diagnóstico clínico é efetuado de acordo com as características da lesão associada à anamnese e aos dados epidemiológicos (ANDRADE, 2011). Devido à variedade de aspectos clínicos que a LT pode produzir e a diversidade de espécies de *Leishmania*, o diagnóstico clínico não é sempre simples e imediato (BRASIL, 2007).

1.3.2 Diagnóstico Laboratorial

Há várias técnicas disponíveis que são empregadas no diagnóstico da LT e, possuem diferentes sensibilidades e especificidades, incluindo técnicas parasitológicas, imunológicas e moleculares (BRUSTOLONI et al., 2007). O diagnóstico laboratorial pode então ser realizado através da pesquisa direta em material de raspado da lesão ou punção aspirativa, exame histopatológico de biópsia de lesão, reação intradérmica de Montenegro, reação de imunofluorescência indireta, e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do DNA de *Leishmania* (GARCIA et al., 2005).

O diagnóstico laboratorial é realizado principalmente através da pesquisa do parasito em material de raspado da lesão corado pelo método de Giemsa (BASANO; CAMARGO, 2004) permitindo a visualização das formas amastigotas intracelulares (MARTINS; LIMA, 2013). A pesquisa do parasito pode ser feita por biópsia ou raspado da lesão cutânea quando ulcerada, preferencialmente na borda da úlcera. As úlceras novas são ricas em parasitas e, conforme a lesão evolui, estes vão se tornando raros. Com relação às lesões inflamadas e as não ulceradas, podem ser executadas aspirações com agulhas finas para preparação de lâminas (SHIRIAN et al., 2014).

Em relação às técnicas imunológicas, a reação intradérmica de Montenegro é o principal teste complementar para LT, consiste num teste de hipersensibilidade tardia utilizando antígeno de *Leishmania* obtidos a partir de culturas. Esse método é extensivamente utilizado em estudos epidemiológicos (JOSÉ et al., 2001). Com relação à técnica de cultura, apesar de ser considerado um método mais sensível quando comparado com a técnica histopatológica, o processo é demorado e corre o risco de haver contaminações, não sendo viável como exame de rotina (BERMAN, 1997; SHIRIAN et al., 2014).

Abordagens moleculares têm sido desenvolvidas com o intuito de detectar a infecção por *Leishmania* (REITHINGER et al., 2007). As técnicas têm por finalidade detectar o DNA de *Leishmania* e, identificar a espécie, que só é possível através de anticorpos monoclonais espécie-específicos e perfil isoenzimático (GRIMALDI; MCMAHON-PRATT, 1996; GOTO; LINDOSO, 2010). Atualmente, os ensaios baseados em reação de PCR constituem a principal abordagem molecular pois oferece vantagem na baixa quantidade de material biológico utilizado e, dependendo do marcador utilizado faz a diferenciação dos agentes infecciosos, que pode ser feito pela análise de polimorfismos dos alvos (BHATTARAI et al., 2009).

1.4 Tratamento

A LT é considerada uma doença de difícil controle que vem apresentando um aumento do número de casos que não respondem ao tratamento. Ainda não existe uma terapêutica que seja ideal para o tratamento da LT, todavia, os antimoniais pentavalentes têm apresentado taxas de cura entre 60 e 90% (URDAPILLETA, 2011).

O Ministério da Saúde do Brasil e a Organização Mundial da Saúde recomendam como drogas de primeira escolha para o tratamento de LT os antimoniais pentavalentes (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA, 2006). Há dois tipos de antimoniais pentavalentes que pode ser utilizado, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime) e o Estibogluconato de sódio (Pentostam), esse último não é comercializado no Brasil. No Brasil, a droga utilizada é o Glucantime e, para leishmaniose cutânea a dose recomendada é de 10 a 20mg de SbV/kg/dia durante 20 dias e, caso não tenha cicatrização em até três meses, repetir o esquema terapêutico por 30 dias. Para leishmaniose mucosa, a dose recomendada é de 20mg/ Sb⁺⁵/kg/dia por um período de 30 dias seguidos e, se não houver cicatrização em três meses, o esquema terapêutico deve ser repetido apenas uma vez (BRASIL, 2010).

O glucantime gera uma rápida regressão das manifestações clínicas e dos parâmetros hematológicos, eliminando o parasito, porém, devido os tratamentos descontínuos e falhas terapêuticas, o número de casos que não respondem ao tratamento com drogas de primeira escolha vem aumentando (RATH et al., 2003). Os casos que não obtiverem resposta após a repetição do tratamento, em LC ou LM, devem-se utilizar drogas de segunda escolha (BRASIL, 2010).

As opções terapêuticas de segunda escolha disponibilizadas no serviço de saúde são: Isotionato de Pentamidina e a Anfotericina B (BRASIL, 2010). Outras drogas como Miltefosina, Imiquimod, Pentoxifilina e Paramomicina também são recomendadas como segunda escolha para o tratamento de LT (ALMEIDA; SANTOS, 2011).

1.5 Evolução da doença

A LT pode evoluir da forma cutânea para a mucosa através da via linfática ou por metástase (via hematogênica), havendo a participação de uma série de fatores nesse processo. A temperatura corpórea foi tida como uma das principais influências da patogênese da LT, onde temperaturas mais baixas favorecem o desenvolvimento das formas amastigotas explicando assim seu favoritismo pelas mucosas (SCOTT, 1985). As razões pela qual ocorre evolução clínica de LC para LM ainda não são totalmente conhecidas. A associação da forma mucosa com o parasito *Leishmania braziliensis* indica que há fatores importantes relacionados com o parasito para o desenvolvimento da lesão (LESSA et al., 2007).

O surgimento das formas clínicas de LT depende de fatores relacionados ao parasito *Leishmania* como a virulência da cepa e tropismo. Ademais, aspectos do vetor, características imunológicas e constituição genética do hospedeiro também podem influenciar no seguimento da infecção (ROGERS et al., 2002; SOUZA, 2014).

Estudos vêm sendo desenvolvidos investigando nas células de lesões de pacientes com LT o perfil imune, principalmente as células T CD4⁺ e T CD8⁺ e, as citocinas produzidas por essas, com ênfase em intérferon – gama (INF - γ) e interleucina – 4 (IL – 4), devido estas apresentarem um papel crucial relacionado com o perfil de resistência a doença Th1⁺ CD4⁺ e, o perfil Th2 + CD4⁺ correlatado com a susceptibilidade para a evolução da infecção (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004; SCOTT; NOVAIS, 2016). A resposta imunológica do hospedeiro que evolui para a forma LM é diferenciada, sendo o quadro imunológico caracterizado pela produção exacerbada de citocinas, IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF – α) (SILVEIRA et al., 2008).

O perfil genético do hospedeiro tem sido relacionado à patogênese da doença com o envolvimento de vários genes já descritos. A genética do hospedeiro tem sido considerada de particular interesse visto que há variabilidade na evolução clínica da doença entre pacientes mesmo quando as condições como a espécie de *Leishmania*, fatores ambientais e nutricionais são similares (SAKTHIANANDESWAREN; FOOTE; HANDMAN, 2009).

Durante a infecção por *Leishmania* ocorre a modulação da resposta imune de macrófagos humanos induzindo a produção ou supressão de genes relacionados com o crescimento, proliferação e sobrevivência da célula através de intervenções no ciclo celular ou apoptose afetando a resposta microbicida da célula. Essas alterações gênicas causadas pelo parasito podem ter via comum com outras patologias. Uma melhor compreensão das funções

dos genes que estão diretamente envolvidos na infecção por *L. braziliensis* permitirá uma melhor compreensão do micro-ambiente da doença (SOUSA, 2012; NASCIMENTO, 2015).

Estudos de associação de genes candidatos têm sido frequentemente realizados em estudos de LT em humanos. Genes da região do Complexo de Histocompatibilidade Maior (MHC) I – III têm sido relacionados com os fenótipos de LC e LM (CASTELLUCCI et al., 2014). Alelos da região de Antígeno leucocitário Humano (HLA) foram associados com a susceptibilidade e resistência em relação à LC (SAMARANAYAKE et al., 2016). Foi verificado que há uma associação significativa do gene HLA DQw3 com a susceptibilidade a LM. O fenótipo de HLA foi tido como regulador do desenvolvimento da lesão secundária (PETZL-ERLER; BELICH; QUEIROZ-TELLES, 1991).

Alguns estudos relatam associação de polimorfismos em genes responsáveis pela regulação da resposta imune, como CXCR1, SLC11A1, IL6, IL10 e TNF α , envolvidos na evolução da doença em infecções humanas causadas por *L. braziliensis* (CABRERA et al., 1995; CASTELLUCCI et al., 2006, 2010; SALHI et al., 2008; RAMASAWMY et al., 2012). Variações genéticas foram descritas no *Toll-like receptor 4* em experimentos realizados com *Leishmania major*, onde foi verificado que as mutações nesse gene aumentam a susceptibilidade e a gravidade da LC, pois esse receptor está envolvido na resposta contra infecção por *Leishmania* (AJDARY et al., 2011).

Em estudo realizado no Estado do Amazonas (Brasil) foi verificado que dois polimorfismos localizados no gene TOLLIP (rs5743899 e rs3750920) estão independentemente associados com um risco aumentado de desenvolver LC em pacientes acometidos por *Leishmania guyanensis*. Esse gene é transcrito numa proteína que interage regulando os receptores semelhantes à *Toll* através das vias de sinalização pró-inflamatórias IL-6 e TNF α (DE ARAUJO et al., 2015).

Castellucci e colaboradores em 2014 demonstraram que polimorfismo no gene FLI1, que está relacionada ao mecanismo de cicatrização, está associado com susceptibilidade a LC causada por *L. braziliensis* (CASTELLUCCI et al., 2011). Foi vista associação entre LC e SNPs em CTGF, TGFBR2, Smad2, SMAD7 e FLI1 e, entre LM e SNPs em Smad3 e SMD7. Esses genes fazem parte da via de sinalização TGF β , mostrando que quando a sinalização é via Smad2 há associação com eventos que contribuem para LC e, quando é via Smd3, está associada com a LM. Ambos são modulados por SMAD7 nessa via. SNPs no SMAD7 afeta ambas as formas LC e LM, bloqueando a via TGF, que estão relacionadas com a regulação do depósito de colágeno e fibrose durante o processo de cicatrização (CASTELLUCCI et al., 2012, 2014).

SNPs localizados no gene COL1A1 foram fortemente associados com a forma LC contribuindo para um melhor entendimento do papel da cicatrização da lesão na LT (ALMEIDA et al., 2015).

Estudo do tipo caso-controle com gene candidato evidenciou que a presença de polimorfismo no Fator Inibidor da Migração de Macrófagos (MIF) 173 alelo C está associado com LC, visto que pacientes com esse alelo produzem níveis mais baixos de MIF, influenciando na interação entre o parasito e o hospedeiro, favorecendo a progressão da doença. MIF está associado com a resposta antimicrobiana do hospedeiro (COVAS et al., 2013).

A presença de um vírus encontrado no parasito *Leishmania*, o *Leishmania* vírus tipo 1 (LRV1), tem sido relatado como um importante fator que contribui para o desenvolvimento da lesão mucosa. Estudos têm demonstrado a associação significativa da presença do LRV1 com a forma mucosa, contudo, nem todos os pacientes com acometimento mucoso apresentaram positividade para LRV1 (ITO, 2014; CANTANHÊDE et al., 2015).

1.6 Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP)

O polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism* - SNP) é o tipo de variação genética mais comum entre os humanos e existem milhões de SNPs no genoma humano (THE INTERNATIONAL HAPMAP CONSORTIUM, 2007). Essas variações podem ser utilizadas como marcadores moleculares, ajudando a identificar genes associados com doenças (CHEN; SULLIVAN, 2003).

A base dos marcadores SNPs são as alterações na molécula de DNA, sendo mutações em bases únicas da cadeia de bases nitrogenadas (Adenina, Timina, Citosina e Guanina). A mutação mais frequente é a de transição, onde ocorre a troca de uma purina por outra purina (A/G) ou, de uma pirimidina por outra pirimidina (C/T). Esses polimorfismos podem ocorrer em regiões com função regulatória ou regiões codificadoras, todavia, a maioria está localizada em regiões sem funções determinadas (CAETANO, 2009). As diferentes alternativas da sequência, que são alelos, existem em indivíduos da população, sendo que o alelo menos frequente apresenta-se na frequência de pelo menos 1 % (BROOKES, 1999).

Os polimorfismos que ocorrem em sítios reguladores de um gene podem alterar a taxa de transcrição alterando a expressão das proteínas codificadas. Nas regiões codificadoras, os SNPs podem ser classificados em duas categorias: SNPs não sinônimos, onde ocorre alteração da sequência de aminoácidos que dará origem a uma proteína e, SNPs sinônimos, que não ocorre alteração na sequência primária de aminoácidos. Os SNPs não sinônimos têm sido

amplamente melhor caracterizados devido ao fato de seus efeitos serem de mais fácil detecção experimental e computacional. SNPs sinônimos foram denominados como mutações silenciosas por não aparentar nenhum efeito perceptível sobre um gene ou fenótipo, porém, recentemente várias mutações sinônimas têm sido relatadas por modificar a expressão de genes ou proteínas. Isso mostra que essa variante genética pode estar relacionada com fenótipos (LIAO; LEE, 2010).

Os polimorfismos, em sua maioria, são observados na forma bi-alélica, ou seja, encontrando apenas dois variantes em um indivíduo. Entretanto, polimorfismos como deleções/inserções, tri- ou tetra-alélicos, entre outros, também são considerados SNPs, mas ocorrem com frequência menor que 1% na população (Figura 6). A combinação de alelos em diferentes *loci* no cromossomo que são transmitidos juntos é denominada de haplótipos (LIAO; LEE, 2010).

Figura 6 – Exemplo de SNPs e de haplótipos

Indivíduos	TCGACTACTCTA...CGTTCAGGCGT...ACGCATTACGGCGTCC				
	TCGACTGCTCTA...CGTTTAGGCGT...ACACATTAGGGCGTCC				
	TCGACTACTCTA...CGTTCAGGCGT...ACACATTACGGCGTCC				
	TCGACTGCTCTA...CGTTCAGGCGT...ACGCATTACGGCGTCC				
	TCGACTACTCTA...CGTTCAGGCGT...ACACATTATGGCGTCC				
	TCGACTACTCTA...CGTTCAGGCGT...ACACATTACGGCGTCC				
SNP	A/G	C/T	G/A	C/G/T	
Haplótipos		A-C-G-C			
		G-T-A-G			
		A-C-A-C			
		G-C-G-C			
		A-C-A-T			

Legenda: Quatro SNPs (A/G, C/T, G/A, e C/G/T) são encontrados, onde A/G, C/T e G/A são bi- alélicos e C/G/T é tri – alélico. Fonte: traduzido de LIAO; LEE, 2010.

Os polimorfismos são causados por substituição de uma base ou por um evento de deleção ou inserção que ocorrem a uma taxa de cerca de 10^{-7} alterações por sítio por geração (SANTORO, 2010). As substituições de base única na sequência tem sido bem caraterizadas desde o surgimento da tecnologia do sequenciamento em 1977, e, indiretamente, os SNPs têm sido utilizados como marcadores genéticos em técnicas baseadas em DNA, como por exemplo, *restriction fragment length polymorphisms* (RFLP) e *amplified fragment length polymorphisms* (AFLP) (CORDEIRO et al., 2006).

Os SNPs tem baixa taxa de mutação, ampla distribuição no genoma, facilidade de automatizar a detecção, podendo ser usado em estudos de distribuição de frequência alélica e

de associação de genes candidatos (SCHLOTTERER, 2004). O emprego de marcadores moleculares SNPs em estudos de associação e mapeamento genético por muito tempo esteve restrito devido às limitações tecnológicas, porém, esse quadro tem mudado nos últimos anos com a chegada de novas tecnologias para a pesquisa de SNPs em massa (CAETANO, 2009).

1.6.1 Associação de SNP a um fenótipo

O termo fenótipo é utilizado para qualificar as características que um determinado indivíduo pode apresentar, como morfológicas, fisiológicas ou comportamentais. O fenótipo pode sofrer alterações com o passar do tempo, pois resulta da interação do genótipo com fatores ambientais (OLAZAR, 2013).

Dois tipos de estudos têm sido abordados comumente para vincular um fenótipo a um SNP de interesse, estudo de associação de gene candidato e, estudo de associação de escala genômica (*Genome Wide Association Studies* - GWAS) (LIAO; LEE, 2010).

Estudo de associação tem como objetivo identificar associação entre uma característica fenotípica e um ou mais marcadores genéticos, onde num loci gênico pode conter alelos relacionados com a susceptibilidade ou resistência a determinadas doenças ou, estar envolvido com características fenotípicas de interesse (OLAZAR, 2013).

No escopo de epidemiologia genética, dentre as abordagens disponíveis para a investigação das relações entre fatores genéticos e doenças infecciosas, podemos empregar o estudo do tipo caso-controle para verificar se um SNP é encontrado em diferentes frequências entre os casos quando comparado ao controle (PEREIRA, 2012).

A pesquisa de associação com genes candidatos é realizada com genes identificados a partir de vias biológicas específicas que tenham suspeita de associação com o fenótipo estudado. Essa dependência do conhecimento prévio de genes ou de vias biológicas que podem não estarem completas, se torna um desafio ao realizar este tipo de estudo, diminuindo a probabilidade de identificar variações num novo gene que possa estar relacionado a um fenótipo (LIAO; LEE, 2010).

Por outro lado, nos casos onde não há indicação previa de genes relacionados, ou ainda quando se procura novos genes independentes de resultados anteriores, a análise de um grande número de genes aumenta a capacidade de identificação das possíveis vias relacionadas a um determinado fenótipo. Pesquisar um número limitado de genes possui vantagem em relação à quantidade de amostra utilizada e o custo, pois se torna menor, porém, novas vias ou genes críticos podem não ser levados em conta na análise (PEREIRA, 2012).

O GWAS propõe determinar os efeitos dos genes sobre o perfil genético dos indivíduos de uma população usando como meio as associações entre regiões moleculares e fenótipos (RESENDE et al., 2012). GWAS podem ser realizados através de estudos de desequilíbrio de ligação, onde algumas combinações de alelos ocorrem em menor ou maior frequência na população do que seria esperado pela formação aleatória de haplótipos e, estudos de associação baseado em famílias ou na população. O estudo de associação baseado na população é conhecido como estudo caso – controle, relacionando indivíduos afetados e não afetados (OLAZAR, 2013). Os GWAS são realizados escaneando um genoma para identificar genes de susceptibilidade a doenças em indivíduos (caso) em comparação com indivíduos sem doença (controle) e, são utilizadas análises estatísticas para identificar se existem diferenças significativas nas frequências dos SNPs entre os grupos, de maneira randômica ou com foco em SNPs de genes de interesse (PEREIRA, 2012).

A variabilidade genética dos hospedeiros pode contribuir para a susceptibilidade ou resistência às doenças infecciosas, e existem técnicas disponíveis para avaliar se existem genes que estão relacionados (GRAHAM; HILL, 2001). Os principais métodos disponíveis para pesquisa de SNPs através de estudos de associação são: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction* - PCR), alelo – específico de oligonucleotídeos, microarranjos de DNA e mais recentemente o sequenciamento genômico completo. A seleção da técnica para identificar SNPs vai depender da aplicação, necessidade e das vantagens e limitações de cada método (SANTORO, 2010). No presente projeto, nos propomos a utilizar a análise de microarranjos de DNA para verificar a presença de SNPs utilizando a plataforma de microarranjos da *Affymetrix*.

1.7 Microarranjos

Microarranjos (do inglês *Microarray*) pode ser definido como uma hibridação de ácidos nucleicos a um conjunto de sondas que se encontram ligadas a um suporte sólido, uma lâmina. Os materiais utilizados para a fabricação das sondas podem ser DNA, cDNA, oligonucleotídeos, RNA mensageiro, proteínas, pequenas moléculas ou qualquer outro material que permita a análise quantitativa dos genes. A escolha da molécula dependerá da aplicação, que pode ser análise de expressão gênica ou análise de variação genética a partir da pesquisa de SNPs, função e caracterização genética (CHAUDHURI, 2005).

A tecnologia do microarranjo evoluiu a partir da técnica criada por Edwin Southern em 1975, conhecida como *Southern blotting*. Nessa técnica é realizada análise de hibridação com o DNA fragmentado permitindo que bandas com sequências similares sejam

identificadas (SOUTHERN, 2006). A matriz de DNA original foi criada com o método de hibridação de colônia, onde o DNA foi clonado a partir de plasmídeos em *E. coli*. Após o crescimento a hibridação de uma sonda marcada radioativamente foi usada para rastrear as colônias para verificar quais continham o DNA que era complementar a sonda (GRUNSTEIN; HOGNESS, 1975).

Em 1979, essa abordagem foi melhorada para que a matriz pudesse ser ordenada (GERGEN; STERN; WENSINK, 1979). Nos anos seguintes, protocolos semelhantes foram utilizados para realizar clonagem de genes específicos, identificação e clonagem de genes com SNPs (BUMGARNER, 2013). Nos anos 1990, ocorreu a automatização desse processo através do uso de sistemas robóticos (LENNON; LEHRACH, 1991). Com o desenvolvimento da clonagem de cDNA e o sequenciamento do genoma humano, foi possível a criação de microarranjos para humanos. Assim, as matrizes evoluíram rapidamente com novos métodos de produção (BUMGARNER, 2013).

A metodologia desenvolvida pela Affymetrix consiste no uso de máscaras fotolitográficas para sintetizar milhões de cópias de oligonucleotídeos, depositando as bases nucleotídicas que serão fixadas em cada posição específica na superfície sólida. Se numa determinada posição específica da superfície laminar deve-se conter uma base específica, a máscara fotolitográfica deixa um orifício nessa região, onde a base poderá ser depositada sem haver contaminação adjacente (as demais regiões que não estão sendo depositadas as bases no momento estão cobertas com máscaras). Através dessa técnica as sondas são sintetizadas base após base na superfície de vidro (ESTEVES, 2007).

O *GeneChip® Human Mapping 500K* da Affymetrix® é composto de duas matrizes que são capazes de genotipar em conjunto 500.000 SNPs. Uma matriz utiliza a enzima Nsp I (~262.000 SNPs) e a outra usa a enzima Sty I (~238.000 SNPs). Cada matriz inclui mais de 6,5 milhões de *spots*, onde cada um contém mais de um milhão de cópias de uma sonda de oligonucleotídeo de 25 pares de bases com uma sequência definida. Existe ainda em cada matriz 50 SNPs que servem como controle interno (AFFYMETRIX, 2006).

O *GeneChip® Human Mapping 250K Nsp I Array* permite a análise simultânea de 262.244 SNPs humanos em um único experimento. Os SNPs estão uniformemente distribuídos pelo genoma humano, com uma distância média de 5,8 kb entre eles e, heterozigose média de 0,30, com base nas populações do projeto HapMap (CEU, YRI, CHB e JPT). A frequência alélica mínima é de 22%. As anotações para cada SNP são fornecidas pelo *GeneChip® Genotyping Analysis Software* (GTYPE) e *NetAffx™ Analysis Center*. Essas anotações combinam dados de múltiplas fontes em um único banco de dados. As informações

de cada SNP incluem: identificação do SNP na base de dados dbSNP, genes próximos, localização física e as frequências alélicas nas populações (AFFYMETRIX, 2006).

Diante das características da evolução dos quadros clínicos da LT e das discussões sobre o papel do parasita e hospedeiro no processo de migração da forma cutânea para a forma mucosa, o presente projeto contempla uma abordagem caso-controle (LC - controle, LM - caso) utilizando um sistema de microarranjos de DNA e GWAS em amostras pareadas de pacientes com as duas formas da doença. Por tratar-se de um tema ainda pouco estudado em leishmaniose, é possível que grandes efeitos dos genótipos sobre o fenótipo possam ser detectados. Além disso, a avaliação das frequências de mais de 250 mil genes nesses dois grupos de pacientes servirá de base de dados consistente para o desenvolvimento de novos estudos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a associação de polimorfismos genéticos às manifestações cutânea ou mucosa da leishmaniose tegumentar em escala genômica.

2.2 Objetivos Específicos

Criar uma lista de SNPs associados comparando o grupo caso (pacientes com LM) com o grupo controle (pacientes com LC) com o uso da metodologia de microarranjos de DNA;

A partir da lista inicial, identificar, utilizando ferramentas genômicas e busca na literatura, genes candidatos que possivelmente influenciam na evolução da doença;

Após a publicação inicial, disponibilizar os dados brutos dos experimentos, respeitando os aspectos éticos relacionados.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos Éticos

Este projeto tem aprovação no comitê de ética com o título Avaliação de Fatores Genéticos e Imunológicos associados à Leishmaniose Tegumentar Americana em Rondônia. Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE nº 54386716.1.0000.0011 (anexo A).

3.2 Casuística

As amostras foram obtidas a partir de lesão de pacientes com LT atendidos no Hospital de Medicina Tropical de Rondônia – CEMETRON, onde são atendidos pacientes oriundos de todo o Estado de Rondônia e de regiões próximas da fronteira com os Estados do Acre e Amazonas. Cerca de 12% dos casos de LC evoluem para LM mas, como descrito anteriormente, os fatores que direcionam essa evolução ainda não são claros. Assim, este projeto está avaliando a frequência de SNPs em pacientes com LC e LM em busca de genes do hospedeiro que possam estar relacionados à evolução do quadro clínico.

Para padronização e otimização da metodologia foram rodados dois chips com amostras femininas.

3.3 Amostras

A rotina de identificação das espécies de *Leishmania* sp. realizada pelo Laboratório de Epidemiologia Genética gerou um banco de amostras de pacientes através do projeto “Detecção de leishmaniavírus em amostras de pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Centro de Medicina Tropical de Rondônia - CEMETRON” com aprovação no CEP/CEPEM no dia 28 de novembro de 2011 com o número 0020.0.046.000-11.

Foram então selecionadas para estudo 29 amostras de LC e 30 amostras de LM oriundas de pacientes do sexo masculino, maiores de 10 anos, com LT causada por *L. braziliensis*, conforme descrito abaixo.

A escolha das amostras no banco foi realizada com base nas informações epidemiológicas disponibilizados no Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (BRASIL, 2010) a fim de aproximar a amostragem ao perfil da LT no estado. Segundo esse manual, a maioria dos casos de LT ocorre em pacientes maiores de 10 anos

(90%) e do sexo masculino (74%), sendo a espécie *L. braziliensis* umas das principais devido estar amplamente distribuída e, ser responsável por casos de lesão cutânea e mucosa.

As amostras do banco foram coletadas utilizando escova cervical estéril colocada em contato direto com a borda da lesão. A partir do material coletado, foi realizada a extração de DNA pela metodologia de centrifugação em coluna de sílica utilizando o kit comercial *Purelink Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen, Califórnia, EUA) seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. A identificação da espécie do parasita na amostra foi realizada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP).

Uma alíquota do DNA foi separada para os ensaios de genotipagem deste projeto. A quantificação inicial das amostras indicou concentrações entre 10 e 30 ng/μL de DNA. Para os ensaios de genotipagem são necessários 50 ng/μL e para tal, 1 μL de cada amostra foi submetido à amplificação do DNA total utilizando o *GenomiPhi V2 DNA Amplification kit* (*General Electric Company Healthcare®*, Reino Unido, Inglaterra) que tem por finalidade amplificar significativamente a quantidade de DNA total pela ação da enzima *phi29* DNA polimerase e de forma altamente precisa devido à atividade de exonuclease 3'-5' dessa enzima.

3.4 *GenomiPhi V2 Amplification Kit*

O protocolo foi executado de acordo com as instruções do fabricante (*General Electric Company Healthcare®*, Reino Unido, Inglaterra). Foram adicionados 9 μL de *Sample buffer* e 1 μL de DNA em tubos de 200 μL. A reação foi submetida a uma desnaturação inicial de 95°C por 3 minutos e depois colocada em gelo. Em seguida, foram acrescentados 9 μL de *Reaction buffer* e 1 μL de *Enzyme mix*. Para amplificação do DNA, o mix foi submetido a 30°C por 90 minutos e para inativação da enzima, 65°C por 10 minutos. As amostras foram quantificadas e diluídas para 50 ng/μL. Em seguida, foram armazenadas no freezer a - 20°C até a próxima etapa ser realizada.

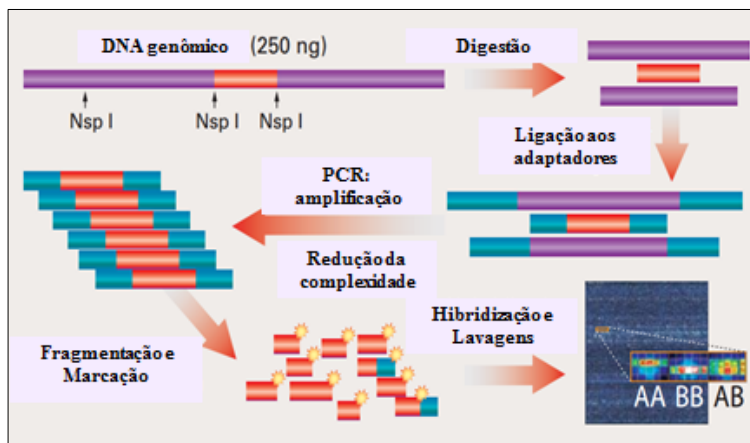
3.5 Genotipagem das Amostras

Para a genotipagem das amostras foi empregada à metodologia de microarranjos de DNA da Affymetrix. A plataforma foi adquirida pelo CNPq no âmbito no INCT – INAGeMP (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional) e transferida para o Laboratório de Genética Humana da Universidade Federal de Rondônia.

O sistema de microarranjos de DNA 250k NspI (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, EUA) permite genotipar aproximadamente 262.000 SNPs. Um resumo dos passos

é mostrado na Figura 7. O protocolo contém várias etapas que foram executadas de acordo com as orientações do fabricante (AFFYMETRIX, 2011), que estão discriminadas abaixo.

Figura 7 – Ensaio de mapeamento Gene Chip Nsp I.



Legenda: A amostra de DNA é submetida à digestão e, em seguida é ligada aos adaptadores que servirão como molde para a amplificação do DNA por meio da PCR. Após, o DNA é fragmentado e marcado com biotina. A amostra é injetada no chip para ocorrer o processo de hibridização. Na sequência ocorre a lavagem do chip e leitura. Fonte: Affymetrix, 2006.

3.5.1 Digestão do DNA Genômico

A digestão foi realizada a partir de 250 ng de DNA genômico utilizando a enzima de restrição NspI (New England BioLabs, Massachusetts, Estados Unidos da América – EUA). Os volumes utilizados por reação foram: H₂O - 9.75 µL; Ne Buffer 2 (10X) - 2 µL; BSA 10X (1 mg/mL) - 2 µL; NspI (10U/µL) - 1 µL e, 5 µL do DNA. O volume final da reação é 19,75µL. As reações foram submetidas às temperaturas de 37°C por 120 minutos para digestão e, 65°C por 20 minutos para inativação térmica da enzima.

O *Reference Genomic DNA 103 (Affymetrix GeneChip Mapping 250 K NspI assay Kit)* foi utilizado como controle positivo na realização dos experimentos e, *UltraPure™ Distilled Water* (Invitrogen) como controle negativo.

3.5.2 Ligação ao adaptador e diluição da amostra

Os adaptadores de NspI foram ligados nas extremidades do DNA digerido (*Affymetrix GeneChip Mapping 250 K NspI assay Kit*) com *T4 DNA Ligase* (New England BioLabs, EUA). As sequências dos adaptadores são: 5' ATTATGAGCACGACAGACGCCTGATCTCATG e 3' AATACTCGTGCTGTCTGCGGACTAGAp 5'.

Os volumes utilizados por reação foram: Adaptador NspI (50 µM) - 0,75 µL; *T4 DNA Ligase Buffer* (10X) - 2.5 µL; *T4 DNA Ligase* (400 U/µL) - 2 µL. Foi adicionado 5,25 µL do

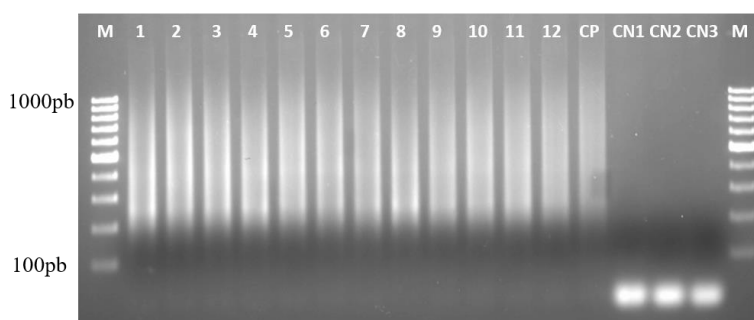
mix em todos os tubo de amostras. O volume final da reação foi 25 μ L. As reações foram submetidas às temperaturas de 16°C por 180 minutos e, 70°C por 20 minutos para inativação da enzima. As amostras foram diluídas quatro vezes com *UltraPure™ Distilled Water* (Invitrogen).

3.5.3 PCR

Foram transferidos 10 μ L de cada amostra diluída no passo anterior para três novos tubos, pois o DNA ligado serviu como molde para amplificação. Para amplificação do DNA foi utilizado *Titanium™ Taq* DNA Polimerase (Clontech, EUA). Foram preparados três mixes por amostra visando uma maior quantidade de DNA amplificado ao final dessa etapa. Os volumes utilizados por reação foram: H₂O - 40 μ L; *Titanium Taq PCR Buffer* (10X) - 10 μ L; G-C Melt (5 M) - 20 μ L; dNTP (2.5mM) - 14 μ L; PCR Primer 002 (100 μ M) 5'ATTATGAGCACGACAGACGCCTGATCT 3' 4.5 μ L e, *Titanium Taq DNA Polymerase* (50X): 1.5 μ L. Após o preparo da solução, 90 μ L foi adicionado em cada amostra. As amostras foram submetidas à desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos, e 30 ciclos (desnaturação - 94°C por 30 segundos, anelamento - 60°C por 30 segundos, e extensão - 68°C por 15 segundos), seguidos de uma extensão final a 68°C por 7 minutos em termociclador *Biocycler MJ96+ / MJ96 G*.

Para checar o resultado da PCR foi realizado eletroforese em gel de agarose a 2%. Foram aplicados 3 μ L de cada amostra e submetidas a 120 V por uma hora. As amostras que apresentaram um padrão entre 200 e 1100 pares de bases foram validadas para continuar com o procedimento (Figura 8). Essa etapa confirma o sucesso das etapas anteriores, digestão, ligação e amplificação.

Figura 8 – Gel de agarose a 2% para checagem da PCR.



Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 a 12: amostras amplificadas; CP: controle positivo; CN1, CN2 e CN3, controles negativos das reações de digestão, ligação e PCR, respectivamente.

3.5.4 Purificação

As amostras foram purificadas utilizando o *DNA Amplification Clean-Up Kit* (Clontech, USA) seguindo instruções do fabricante conforme protocolo descrito a seguir.

Foi adicionado 8 μL de EDTA 0.1 M em cada tubo de PCR; em seguida, juntou-se as 3 reações de PCR em um mesmo poço da placa; foi aplicado pressão negativa e aumentada lentamente até 600 mbar (450 mmHG); a pressão foi mantida ligada até o final do processo de purificação; os tubos secaram por aproximadamente 2 horas; em seguida, os poços foram lavados três vezes com 50 μL de *UltraPure™ Distilled Water* (Invitrogen), deixando os tubos secarem a cada lavagem por 20 minutos. Após as lavagens as amostras foram secadas completamente por 60 minutos.

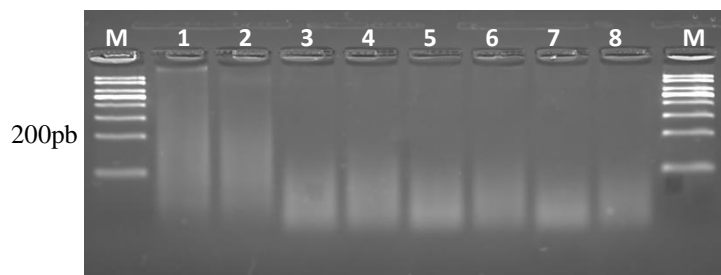
As amostras foram eluídas com 45 μL de RB Buffer que é fornecido no kit de purificação. A placa foi agitada por 10 minutos a 1000 RPM. Recuperou-se 45 μL de cada poço e transferiu para um novo tubo. O DNA purificado foi quantificado por espectrofotômetro NanoDrop 2000 e normalizado com RB Buffer para a concentração final de 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.5.5 Fragmentação

Na etapa de fragmentação (utilizando *Affymetrix GeneChip Mapping 250 K Assay Kit*) foram adicionados 5 μL de 10X *Fragmentation Buffer* a cada tubo com 90 μg de DNA em 45 μL do purificado. Em seguida, o *Fragmentation Reagent* foi diluído para 0.05U/ μL utilizando por reação: *Fragmentation Reagent* (2.5 U/ μL) - 0.1 μL ; *UltraPure™ Distilled Water* (Invitrogen) - 4.4 μL e, *Fragmentation Buffer* (10X) - 0.5 μL . Foram adicionados 5 μL do *Fragmentation Reagent* diluído a cada amostra e, em seguida, as amostras foram incubadas a 37°C por 35 minutos e, seguida de um período de inativação de 95°C por 15 minutos.

O resultado da fragmentação foi verificado em gel de agarose a 4% com 3 μL da reação diluída com 2 μL de *Gel Loading Buffer* (Fermentas Life Sciences, EUA), submetidas a 120 V por 50 minutos. As etapas seguintes foram realizadas com as amostras que apresentaram fragmentação abaixo de 200 pares de bases (Figura 9).

Figura 9 – Gel de agarose a 4% para checagem da Fragmentação.



Legenda: M: Marcador de peso molecular de 100 pb; 1 e 2: amostras não fragmentadas; 3 a 8: amostras fragmentadas.

3.5.6 Marcação

A marcação do DNA foi realizada com biotina através da ação da enzima *Terminal Deoxynucleotidyl Transferase* (TdT), a qual catalisa a transferência de uma biotina para a extremidade 3' do DNA (*Affymetrix GeneChip Mapping 250 K Assay Kit*). Os volumes utilizados por reação foram: TdT Buffer (5X) - 14 μ L; DNA Labeling Reagent (30 mM) - 2 μ L e, TdT (30U/ μ L) - 3.5 μ L. O mix de marcação foi colocado na amostra fragmentada (vol. final 70 μ L). A incubação ocorreu a 37°C por 4 horas e, seguida de um período de inativação de 95°C por 15 minutos.

3.5.7 Hibridação

A etapa de hibridação foi realizada no *GeneChip Hybridization Oven 645* (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, EUA). Para preparar o mix da reação é necessário o preparo do 12X MES. Os reagentes utilizados para preparar 1,0 L são: MES hidratado - 70.4 g; MES Cloreto de Sódio - 193.3 g; 800 mL de água destilada autoclavada. O pH deve estar entre 6,5 e 6,7. Após aferir o pH, a solução foi filtrada com filtro 0,2 μ m e armazenada a 4°C, protegida da luz.

A solução de hibridização foi preparada com 12X MES (1,22 M) - 12 μ L; DMSO (100%) - 13 μ L; *Denhardt's Solution* (50X) - 13 μ L; EDTA (0,5 M) - 3 μ L; *Herring Sperm DNA* (10mg/mL) - 3 μ L; Oligo Control Reagent - OCR, 0100 - 2 μ L; Human Cot-1 DNA (1mg/mL) - 3 μ L; Tween[®] 20 (3%) - 1 μ L e, TMACL (5 M) - 140 μ L. O volume final por amostra foi de 190 μ L. O mix pode ser armazenado a - 20°C.

O DNA marcado (70 μ L) foi transferido para um tubo de 1,5 mL e, o mix da solução de hibridização foi adicionado (vol. final 260 μ L). As amostras foram desnaturadas por 10 minutos a 95°C e resfriadas no gelo por 10 segundos; em seguida foram mantidas a 49 °C até aplicação no chip. Os chips foram equilibrados a temperatura ambiente e identificados.

Colocou-se uma ponteira em um dos septos para permitir a passagem de ar durante a aplicação da amostra. Foram injetados 200 µL de cada amostra em seu respectivo chip. A hibridização da amostra com as sondas presentes no *Genechip® Human mapping 250K Nsp Array* ocorreu a 49°C por 18 horas no *Hybridization Oven* (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, EUA).

3.5.8 Lavagens, Coloração e Leitura

As etapas de lavagens, colorações com estreptavidina conjugada com ficoeritrina (SAPE 1 mg/mL; *Molecular Probes, Life Technologies*, Oregon, EUA) e com o anticorpo anti-estreptavidina biotinilado (*Vector Laboratories*, Califórnia, EUA) foram realizadas com o *GeneChip Fluidics Station 450* (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, EUA).

Para essa etapa foi necessário preparar as soluções que estão descritos a seguir: *Wash A* (6X SSPE, 0,01% *Tween*® 20), volumes para 1,0 L: 20X SSPE - 300 mL; *Tween*® 20 10% - 1 mL; H₂O destilada autoclavada - 699 mL. Foi filtrado com filtro 0,2 µm e armazenado a temperatura ambiente.

Wash B (0,6X SSPE, 0,01% *Tween*® 20), volumes para 1,0 L: 20X SSPE - 30 mL *Tween*® 20 10% - 1 mL; H₂O destilada autoclavada - 969 mL. Foi filtrado com filtro 0,2 µm e armazenado a temperatura ambiente.

Para preparar o *Stain Buffer* (volumes para 1 *chip*) foram utilizados: H₂O destilada autoclavada - 800.04 µL; SSPE (20X) - 360 µL; *Tween*® 20 3% - 3.96 µL; *Denhardt's Solution* (50X) - 24 µL. O volume final da solução (1188 µL) foi dividido por dois devido ser a quantidade exata para o preparo dos reagentes *SAPE Stain Buffer* e *Antibody Stain Solution*.

Para preparar o *SAPE Stain Buffer* foram utilizados: *Stain Buffer* - 594 µL e, SAPE - 6 µL. O reagente foi homogeneizado e armazenado a 4°C protegido da luz.

Para preparar o *Antibody Stain Solution* foram utilizados: *Stain Buffer* - 0.594 mL e, anti-estreptavidina biotinilado 0.5 mg/mL - 6 µL. O reagente foi homogeneizado e armazenado a 4°C protegido da luz.

Para preparar o *Array Holding Buffer* foram utilizados: 12 X MES - 8.3 mL; NaCl 5 M - 18.5 mL; *Tween*® 20 10% - 100 µL e, H₂O destilada autoclavada - 73.1 mL. O reagente foi homogeneizado e armazenado a 4°C protegido da luz. Foram feitas alíquotas de 840 µL em tubos de 1.5 mL.

Os chips foram lavados com os tampões *Wash A* e *Wash B* para remover reagentes em excesso e sondas que tenham se ligados de formas inespecíficas. Em seguida, sucessivos

ciclos de incubação com *SAPE Stain Buffer* e *Antibody Stain Solution* foram realizados para amplificação do sinal de marcação.

Após o processo de lavagem e coloração, a leitura do chip foi realizada no *GeneChip Scanner 3000 7G* (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, EUA).

3.5.9 Coleta e Análise dos dados de Microarranjos de DNA

Após a leitura dos microarranjos no GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix Services Lab, Santa Clara, CA, EUA), os resultados foram inicialmente processados no programa *Affymetrix GeneChip Command Console* (AGCC), onde são processados e armazenados as informações acerca da intensidade de sinal em cada *pixel* dos arranjos. O programa gera uma série de arquivos que são posteriormente utilizados para uma análise primária e tratamento dos dados no programa *Genotyping Console* (GTC) da Affymetrix.

Os arquivos “cel” são analisados pelo GTC que utiliza o algoritmo *Bayesian Robust Linear Model with Mahalanobis distance classifier* (BRLMM) para obter os genótipos dos indivíduos gerados a partir dos dados de intensidade de sinal nos *pixels* dos microarranjos. O arquivo também armazena informações sobre a qualidade da leitura dos dados do arranjo, refletindo o *call rate*, que pode ser considerado como a porcentagem de SNPs que podem ser atribuídos a um genótipo. O *call rate* é gerado para cada *array* pelo GTC através de um algoritmo baseado em Modelo Dinâmico (DM). A Affymetrix recomenda o uso dos dados de um *array* com um QC *call rate* $\geq 86\%$ e, *call rate* $\geq 93\%$ (AFFYMETRIX, 2006).

O algoritmo BRLMM fornece uma melhora significativa para os resultados de DM melhorando o desempenho geral (*call rate* e acurácia) e, equaliza o desempenho dos genótipos homozigotos e heterozigotos (AFFYMETRIX, 2006).

Os dados obtidos nas leituras dos chips ficam armazenados no GTC em forma de tabela e, podem ser exportados para dois tipos de arquivos de texto. Um mais inteligível, com os dados separados por tabela e, o outro, formatado para ser utilizado por um conjunto de ferramentas de análises de dados de varredura genômica de código aberto (PLINK) (PURCELL et al., 2007; PEREIRA, 2012).

3.6 PLINK e gPLINK

O PLINK é um conjunto de ferramentas de código aberto de análise de associação do genoma completo, projetado para executar análise em larga escala de forma eficiente, realizando a análise dos dados de genótipo/fenótipo, não havendo suporte para etapas anteriores a essa. O nome padrão do arquivo é “plink.ext”, onde “.ext” mudará dependendo do

conteúdo do arquivo. A maior parte dos arquivos de saída está num formato constituído por uma linha de cabeçalho e um número de colunas por linhas (PURCELL, 2010).

Além do comando descrito acima, os arquivos PED e MAP podem ser especificados. Esses são arquivos de texto simples, onde PED contém as informações genótípicas (um indivíduo por linha) e, o arquivo MAP, contém as informações sobre o nome e as posições no arquivo PED. Para gerar o arquivo PED são necessárias que as seguintes informações estejam atribuídas as amostras antes da importação dos dados do GTC: ID da família, ID individual, ID Paternal, ID Materno, Sexo (1 = masculino, 2 = feminino) e, Fenótipo (1= não afetado, 2 = afetado) (PURCELL, 2010).

O comando básico gera um arquivo de associação “as1.assoc”, que é um arquivo de saída onde cada linha é um resultado do teste clássico de associação de cada SNP com os grupos em estudo (LM x LC). O arquivo contém as seguintes informações, dispostas em colunas: cromossomo, identificador de SNP, código para o alelo 1 (alelo de menor frequência nas populações de referência), a frequência dessa variante nos casos, a frequência dessa variante nos controles, código para o outro alelo, estatística do Qui – quadrado para esse teste, valor de probabilidade da distribuição assintótica para este teste e o risco relativo para cada comparação (PURCELL, 2010). O valor de probabilidade do Qui-quadrado observado servirá de base para as análises subsequentes.

A ferramenta gPLINK foi desenvolvida para integrar o PLINK ao Haploview no intuito de facilitar a visualização, filtragem e plotagem dos arquivos gerados por PLINK. O gPLINK é um programa Java de acesso livre que fornece uma interface gráfica simples para os comandos PLINK mais utilizados normalmente (invés de usar as opções de linha de comando). O gPLINK propicia menus e caixas de diálogo para que sejam criados e executados comandos PLINK válidos. O programa mantém um registro de todos os comandos que foram executados no projeto, arquivos de entrada e de saída, permitindo a anotação de arquivos de resultados e melhorando a integração com o Haploview (PURCELL, 2010).

Opcionalmente, o programa gPLINK pode ser usado para agrupar precedentemente as análises gerada pelo PLINK. Assim, permite uma melhor organização dos resultados e facilita a navegação com Haploview.

3.7 Haploview

Haploview é um programa projetado para fornecer um conjunto de ferramentas para análise de haplótipos de maneira simplificada e eficiente. O programa pode desempenhar diversas funcionalidades: análise de LD e blocos de haplótipos; estimação da frequência de

haplótipos na população; testes de associação de haplótipos e SNPs e, visualização e plotagem dos resultados de associação do PLINK (através da integração gPLINK) incluindo opções avançadas de filtragens. Todos os recursos disponíveis podem ser personalizados e, os cálculos são feitos em tempo real ainda que para conjunto de dados com centenas de indivíduos e centenas de marcadores (BARRETT et al., 2005).

Logo após o carregamento do conjunto de dados, o programa apresenta ao usuário medidas de qualidade do marcador de genotipagem, incluindo uma verificação de compatibilidade com *Hardy – Weinberg*, que é um registro de erro da herança mendeliana e, a porcentagem de indivíduos que foram genotipados para este marcador com êxito (BARRETT et al., 2005).

3.8 Integrative Genomics Viewer (IGV)

O IGV é considerado uma ferramenta de visualização leve e eficiente para grandes conjuntos de dados e faz integração de diversos tipos de dados de forma flexível. IGV possibilita examinar em tempo real vários conjuntos de dados genômicos em larga escala. O programa permite integração flexível de uma gama de tipos de dados genômicos como mutações, número de cópias, expressão gênica, metilação e anotações genômicas (ROBINSON et al., 2012). A visualização dos dados de associação dos SNPs foi feita através de um *Manhattan plot* (TURNER, 2014) utilizando como genoma de referência *Human hg19* (para o mapeamento dos sítios) (THORVALDSDÓTTIR; ROBINSON; MESIROV, 2013).

O programa também utiliza uma coleção de sequências de referência (*NCBI's Reference Sequence – RefSeq*), que é um banco de dados de livre acesso que fornece anotações de DNA, RNA e proteínas. A referência fornecida é considerada estável para anotação do genoma, identificação e caracterização de genes, análise de polimorfismos e mutação, estudos de expressão e, análise comparativa. Por ser de natureza não redundante, RefSeq facilita a consulta de banco de dados baseado na localização genômica, sequência ou anotação de textos (PRUITT, 2012). O arquivo com os genes já anotados do RefSeq foi incluído na visualização do IGV a fim de identificar os genes relacionados aos SNPs selecionados neste trabalho.

3.9 Correção de Bonferroni

A correção de Bonferroni é utilizada para fazer a correção do nível de significância de testes de múltipla comparação, podendo ser usado quando está sendo realizados simultaneamente vários testes estatísticos, dependentes ou independentes, (SHAFFER, 1995) considerando que um valor pode ser adequado para cada teste de comparação individual, mas,

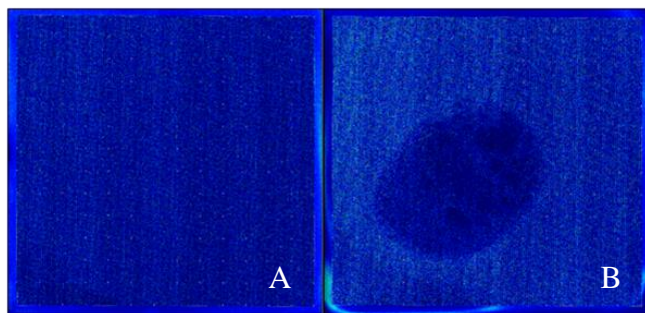
não é para agrupamento de todas as comparações. Para evitar o número de falsos positivos, o valor é reduzido para realizar as comparações (WEISSTEIN, 2016). Considerando o nível de significância de 5% tipicamente utilizado em estudos de associação, e que no microarranjo são testados cerca de 262.000 SNPs, e que para cada SNP é realizado um teste de associação, o nível de significância α global do experimento seria de $0,05/262.000 = 1,9 \times 10^{-7}$.

4 RESULTADOS

Foi realizada a leitura de 69 chips, dos quais 66 geraram os arquivos necessários para a genotipagem devido a problemas técnicos do chip. Cinquenta e nove chips foram considerados aptos para prosseguir com a análise tendo como base a métricas QC. Sete chips foram excluídos por apresentarem valores de QC abaixo de 80 (6 amostras), e um paciente do sexo masculino foi genotipado como sendo feminino.

Os dados de sondas e intensidades foram sumarizados no programa AGCC. Na Figura 10 podemos observar a imagem do escaneamento de um chip com alta qualidade (Figura 10A) e outra de baixa qualidade de leitura por conta de problemas no carregamento do chip.

Figura 10 – Imagens geradas no escaneamento do chip.

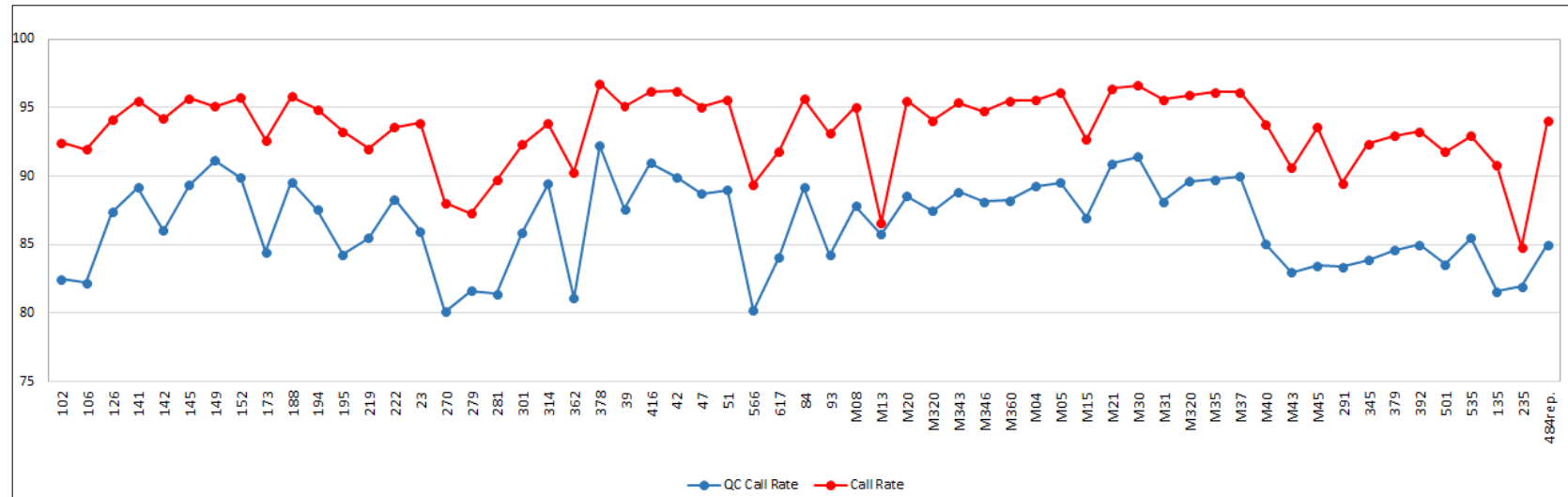


Legenda: Imagem de alta qualidade (A) e, imagem de baixa qualidade (B).

Os arquivos gerados para cada indivíduo foram exportados para leitura no programa *Genotyping Console GTC* para organizar os conjuntos resultantes de dados, mostrando os atributos das amostras e intensidades respectivamente. O valor de *QC Call Rate* indica a porcentagem de SNPs validados e deve ser ≥ 86 (AFFYMETRIX, 2006). No Apêndice A encontramos os valores de QC das 59 amostras analisadas.

A genotipagem das amostras disponibilizou os valores de *call rate*, que indica a porcentagem dos SNPs a qual se pode atribuir um genótipo, sendo preconizado pela Affymetrix usar $\geq 93\%$. No Apêndice A encontramos os valores de *call rate* das 59 amostras analisadas. Para uma melhor visualização dos dados *QC call rate* e *call rate* os valores podem ser observados no gráfico 2.

Gráfico 2 – Valores de QC *call rate* e *call rate* das amostras.



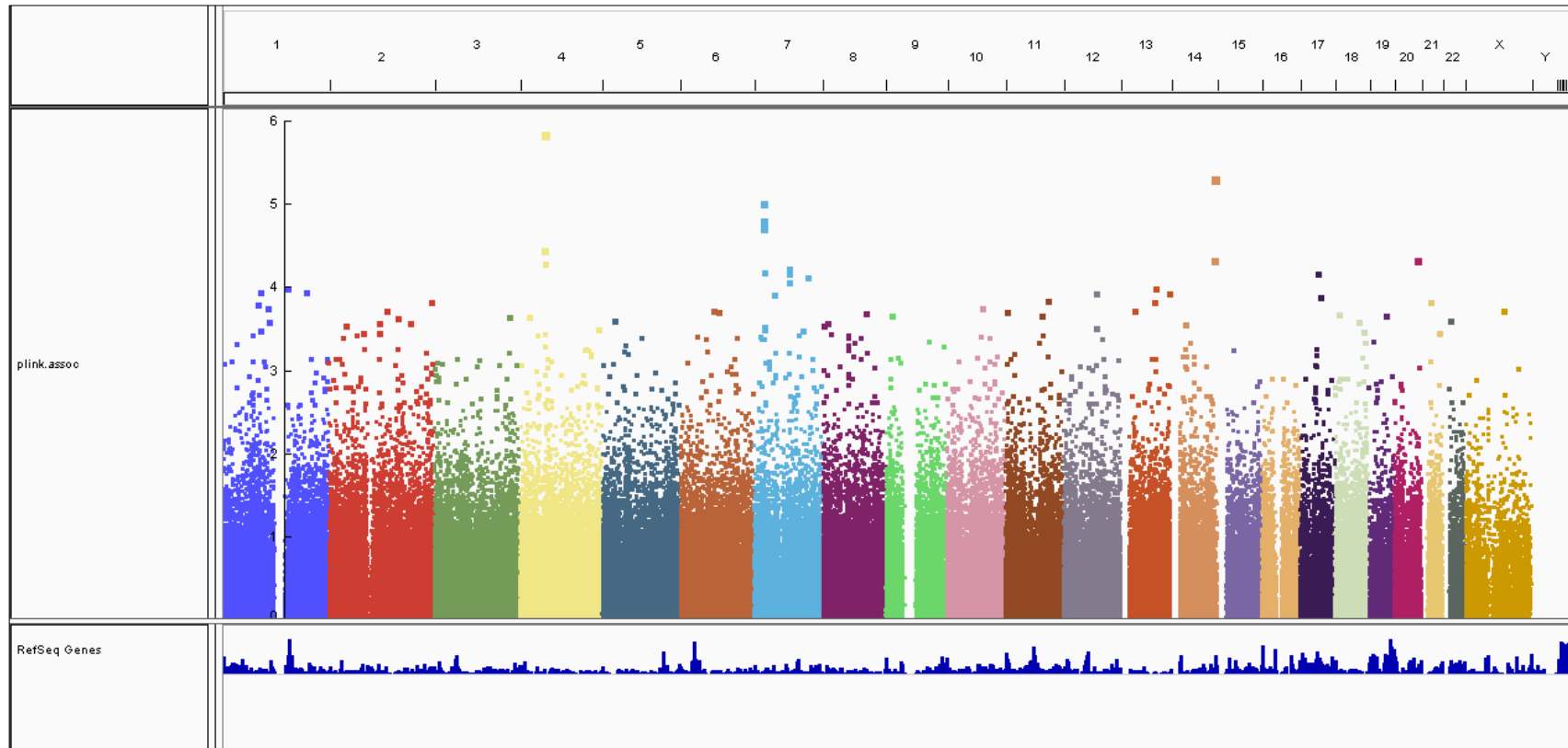
Legenda: Na ordenada observa-se os valores de QC *call rate* e *call rate* e, na abscissa as amostras processadas. O valor de QC *call rate* representa a porcentagem de SNPs validados num teste e, o valor do *call rate* a porcentagem de SNPs que podem ser atribuídos a um genótipo.

Dessa forma, foram gerados cerca de 15.458.000 genótipos. Os dados de genotipagem foram exportados para serem utilizados no PLINK e gPLINK, gerando o arquivo com os dados de associação, com dados de aproximadamente 262.000 testes de hipótese de associação. Para observar os resultados de maneira global, foi utilizado o gráfico de *Manhattan Plot* (Figura 11), gerado no IGV. Em uma primeira análise utilizando a abordagem GWAS não foram observadas associações significantes considerando nível de significância determinado pela aplicação da correção de Bonferroni. Considerando que a correção de Bonferroni é reconhecidamente conservadora, foram analisados os 15 SNPs com maior indicação de associação com o fenótipo abordado. Desses, foi possível listar três possíveis genes candidatos relacionados com a evolução da LT (C20orf85, GRM8 e PCLO).

O programa pLINK realiza para cada SNP um teste de qui-quadrado de teste alélico básico, que compara a frequência dos alelos nos casos com a frequência dos alelos nos controles. Nos gráficos 3 e 4, no apêndice B, encontra-se um exemplo de associação do genótipo com o fenótipo de um SNP com grau de probabilidade de associação, e um exemplo de associação do genótipo com o fenótipo de um SNP sem grau de probabilidade de associação, respectivamente.

Na tabela 1 são apresentadas as informações dos SNPs com maior indicação estatística de associação e a identificação dos genes. Somente cinco dos 15 SNPs selecionados estão em genes já anotados no RefSeq. Os genes mais próximos da região onde se localiza o SNP foram descritos.

Figura 11 – Dados de GWAS mostrando valores de Probabilidade (*Manhattan Plot*).



Legenda: O gráfico representa a significância entre um SNP e a característica a ser medida. Na parte superior do gráfico estão identificados os cromossomos. Na ordenada podemos observar os valores de P na base $-\log_{10}$ dos 262.000 SNPs genotipados e, na abscissa as posições cromossômicas dos SNPs. O SNP com maior indicação de associação identificado neste trabalho está localizado no cromossomo 4. O tamanho dos pontos de dados no gráfico e sua altura estão relacionados diretamente com sua significância: quanto maior o ponto e mais alto na escala do lado esquerdo do painel, mais significativa é a associação com o traço. O programa utiliza uma coleção de sequências de referência de anotações gênicas (*NCBI's Reference Sequence – RefSeq*) a fim de identificar os genes relacionados aos SNPs.

Tabela 1 – Informações do *Genome Wide Association Studies*.

CHR	Marcador	BP	A1	F_A	F_U	A2	P	Genes associados	Genes próximos (█ = local do SNP)
4	rs2128439	60436293	A	0,12	0,5952	T	1,56E-06	-	POLR2B, IGFBP7 █ LPHN3, TECRL
4	rs12499269	60425057	C	0,1034	0,4464	G	3,88E-05	-	POLR2B, IGFBP7 █ LPHN3, TECRL
4	rs7699155	59624687	G	0,4	0,07407	T	5,42E-05	-	POLR2B, IGFBP7 █ LPHN3, TECRL
14	rs4465541	105016847	G	0,119	0,6053	C	5,29E-06	-	ASPG, KIF26A █ C14orf180, TEMEM179
14	rs9888595	104778024	G	0,2174	0,65	A	4,99E-05	-	ASPG, KIF26A █ C14orf180, TEMEM179
7	rs11768244	25767091	A	0,4833	0,1071	G	1,03E-05	-	CYCS, NPVF █ RNU6 – 16P, MIR148A
7	rs17152406	25762903	C	0,5	0,125	A	1,66E-05	-	CYCS, NPVF █ RNU6 – 16P, MIR148A
7	rs86	25700286	C	0,5962	0,1964	T	2,07E-05	-	CYCS, NPVF █ RNU6 – 16P, MIR148A
7	rs17152208	25716841	C	0,5	0,1552	T	6,86E-05	-	CYCS, NPVF █ RNU6 – 16P, MIR148A
7	rs12707523	82486467	G	0,1111	0,4615	C	6,23E-05	PCLO	CD36, HFG █ SEMA3E, SEMA3A
7	rs12707524	82486615	G	0,05	0,3393	A	7,14E-05	PCLO	CD36, HFG █ SEMA3E, SEMA3A
7	rs7795945	82485050	A	0,1	0,4138	G	9,10E-05	PCLO	CD36, HFG █ SEMA3E, SEMA3A
7	rs2299536	126756965	A	0,1379	0,4815	G	7,78E-05	GRM8	POT1, MIR592 █ ZNF800, GCC1
20	rs4810120	56732801	G	0,6786	0,2885	A	5,08E-05	C20orf85 (LLC1)	PMEPA1, MIR4532 █ PPP4R1L, RAB22A
17	rs2732706	44351686	T	0,4333	0,09615	C	6,96E-05	-	KANSL1, KANSL1-AS1 █ LRRC37A, ARL17A

Legenda: Informações referente ao cromossomo (CHR), identificação do SNP (marcador), posição (BP), alelo 1(A1), frequência no grupo com leishmaniose mucosa caso (F_A), frequência no grupo com leishmaniose cutânea controle (F_U), alelo 2 (A2), valor de P, genes associados ao loci do SNPs e, genes localizados nas laterais dos SNPs.

5 DISCUSSÃO

A proposta do projeto desenvolvido foi a de verificar a presença de fatores genéticos relacionados com a progressão da LC para a forma mucosa (LM) verificando SNPs que possam estar relacionados com o fenótipo da doença. Este é o primeiro estudo de associação por varredura genômica avaliando fenótipos clínicos em LT. Essa avaliação foi realizada em amostras provenientes de pacientes atendidos no CEMETRON, com LC e LM, infectados com *L. braziliensis*, incluindo pacientes da região de Porto Velho – RO.

A base de dados gerada pode ser analisada sob uma ampla diversidade de metodologias e permite que outras questões sejam investigadas, como por exemplo, composição étnica, estimativas de consanguinidade, além de outros estudos de genética de populações e de genética clássica, ou mesmo com metodologias mais complexas para estudos de associação como por exemplo efeito conjunto de genes, haplótipos, *imputing*, meta-análise, dentre outros. Outro caminho de análise possível seria o de avaliar os estudos publicados com sugestão de associação e verificar como os SNPs nesses genes se distribuem na amostra estudada.

Análises de GWAS envolvem extensos grupos de dados que permitem analisar os efeitos sobre uma ampla gama de características humanas, doenças, e a qualidade desses dados são cruciais para consistência das análises. Diante disso, diversos parâmetros são avaliados antes da inclusão de um determinado resultado no fluxo de comparações, dentre eles o QC e a aplicação de filtros para controle de qualidade minimizando a influência de artefatos na genotipagem (CONSORTIUM, 2007; MCGEACHIE et al., 2014).

Neste estudo estão incluídos os resultados de 21 chips que estavam com *call rate* abaixo (84-93%) do mínimo recomendado: 93% (AFFYMETRIX, 2006). Os valores abaixo da referência se devem ao processo de congelamento e descongelamento de amostras e tempo de armazenamento como foi observado no trabalho de Pereira (PEREIRA, 2012), que realizou sua pesquisa com 80 amostras e, 77 estavam com o *call rate* abaixo do indicado pela Affymetrix (PEREIRA, 2012). Segundo o *GeneChip® Mapping 500K Assay Manual* o valor de *Call Rate* abaixo do desejado pode ser devido a uma série de fatores, incluindo erros durante as etapas do ensaio, uso de DNA de baixa qualidade, desvios do protocolo e reagentes com datas expiradas. É aconselhado, dependendo do grau de comprometimento da amostra, repetir o protocolo de preparo da mesma (AFFYMETRIX, 2011).

Levando-se em conta apenas a correção de Bonferroni, as associações significativas deveriam apresentar valores de probabilidade abaixo de $1,9 \times 10^{-7}$. Considerando a correção no presente estudo, nenhum SNP apresentou associação com esta probabilidade. Ainda que a

correção de Bonferroni seja comum, essa é uma correção conservadora, que minimiza apenas a probabilidade de falsos positivos no sentido que a probabilidade de rejeição da hipótese nula (nível de significância - α) é baixa, de forma que a probabilidade de rejeitarmos uma associação estatística que reflita de fato uma associação com relevância biológica é grande (erro tipo II). Por outro lado, aumenta a probabilidade de falsos negativos e acaba por reduzir a chance de detecção de eventos com menores efeitos sobre as frequências dos alelos, especialmente quando utilizamos amostras pequenas. Uma ampla discussão nesse sentido está em andamento, e alguns trabalhos optaram por utilizar o limiar de 1×10^{-5} devido já ter sido preconizado na literatura (NAKAOKA; INOUE, 2009; PEREIRA, 2012; MCGEACHIE et al., 2014).

Sendo assim, após a análise dos dados, foram avaliados os 15 SNPs com maior probabilidade de associação, que estão no limiar de 1×10^{-6} e 1×10^{-5} . Entre os polimorfismos selecionados, somente cinco estão em genes já anotados no banco de dados RefSeq (um SNP nos genes C20orf85 e GRM8, e três no PCLO).

O SNP com maior indicação de associação identificado neste trabalho está localizado no cromossomo 4 na região q13.1, SNP rs2128439. Até o momento, não há gene anotado nessa posição. Outros dois SNPs com indicação de associação foram identificados nessa região do mesmo cromossomo, rs12499269 e rs7699155. Os genes localizados próximos desses SNPs são: POLR2B, IGFBP7, LPHN3 e TECRL. O gene POLR2B codifica a segunda subunidade maior da RNA polimerase II, uma polimerase que catalisa a transcrição de DNA em precursores de mRNA, snRNA e microRNA. Após estudos, esse gene foi considerado como candidato relacionado com a altura humana (HU et al., 2016). O IGFBP7 codifica um membro da família de proteínas de ligação do fator de crescimento (proteína de ligação 7) que está relacionada com a estimulação da produção de prostaciclina e adesão celular, sendo que a superexpressão desse gene foi associada com a progressão do tumor e menor sobrevida no câncer gástrico (SATO et al., 2015).

O gene LPHN3 codifica o receptor L3 da família *Latrophilin* que é acoplado à proteína G, onde esse receptor atua na transdução de sinal e adesão celular. Foi sugerido que o haplótipo CGC nesse gene causado pela presença dos SNPs rs6813183, rs1355368 e rs734644, é um haplótipo de risco podendo levar a susceptibilidade para o déficit de atenção com hiperatividade (BRUXEL et al., 2015). A proteína trans-2,3-enoil-CoA redutase é codificada pelo gene TECRL e, está relacionada segundo estudos com a arritmia cardíaca hereditária (DEVALLA et al., 2016). Sendo assim, a partir das informações disponíveis para esses genes próximos dos SNPs identificados, não foi possível estabelecer nenhuma relação direta ou funcional entres os mesmos e o grupo estudado.

No cromossomo 4, numa região próxima aos SNPs descritos (região p14), estão anotados os genes TLR1, TLR6 e TLR10. Esses genes codificam membros da família de receptores do tipo *Toll-like* (TLR) que reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são expressos em agentes infecciosos e, através desse reconhecimento ativam a produção de citocinas para desenvolver uma imunidade eficaz. Embora os TLRs tenham uma contribuição potencial na proteção da infecção por *Leishmania*, há evidências crescentes de que, em alguns casos, esses receptores facilitam a infecção por *Leishmania* (FARIA; REIS; LIMA, 2012).

A proteção induzida contra *L. panamensis* é dependente da modulação da resposta imune via TLR1/2 (JAYAKUMAR et al., 2011) enquanto que, a presença de um polimorfismo no TLR1 foi associada com uma maior parasitemia em indivíduos acometidos por Malária causada por *Plasmodium falciparum* no Sudeste Asiático (HAHN et al., 2016). A associação entre TLR2 e TLR6 diminui a infecção por *L. major* em macrófagos infectados, mostrando o papel protetor desses receptores do hospedeiro (PANDEY et al., 2014). O TLR10 é descrito como um receptor modulador da resposta imune inata a patógenos relacionados com as infecções complicadas da pele e da estrutura da pele e, as variantes genéticas desse receptor estão associadas à proteção contra essas infecções que envolvem a pele (STAPPERS et al., 2015).

O gene TLR3 está anotado no cromossomo 4, na região q35.1. Já foi demonstrado que o receptor TLR3 é intracelular e, reconhecido pela *Leishmania*, que ativa a produção de óxido nítrico e TNF- α em macrófagos em infecções por *L. donavani* (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006). O receptor TLR3 reconhece o leishmaniavírus (LRV1), que parasita o protozoário *Leishmania*, induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. A presença desse vírus colabora para a progressão da metástase na LT (IVES et al., 2011).

Assim como observado não encontramos relação entre os SNPs com melhor indicação de associação do cromossomo 4 e os genes mais próximos descritos, porém, a descrição de genes que estão relacionados com a resposta imunológica em infecções pelo parasito *Leishmania* em regiões próximas torna esses polimorfismos sugestões para trabalhos futuros.

Os SNPs rs4465541 e rs9888595 identificados com indicação de associação estão localizados no cromossomo 14 na região q32.33. Ambos se encontram em uma região sem anotação gênica até o momento. Os genes mais próximos dos SNPs são ASPG, KIF26A, e C14orf180 e TEMEM179. O gene ASPG codifica a proteína asparaginase que é capaz de hidrolisar o aminoácido L asparagina (NOMME; SU; LAVIE, 2014); o gene KIF26A codifica uma cinesina que está relacionada com o desenvolvimento do sistema nervoso entérico (ZHOU

et al., 2009); C14orf180 é um ortólogo do gene NRAC, que é considerado um marcador de adipócitos (ZHANG et al., 2012) e, o gene TEMEM179 codifica a proteína transmembranar 179 e, até o momento não há trabalhos publicados no banco de dados PubMed Central com esse gene.

Foram identificados quatro SNPs com probabilidade de associação na região p15.3 do cromossomo 7, SNPs rs11768244, rs17152406, rs86 e rs17152208 respectivamente, ambos em região sem anotação gênica até o momento. Os genes estruturalmente mais próximos desses SNPs, anotados no RefSeq são: CYCS, NPVF, RNU6 – 16P e MIR148A. O gene CYCS codifica a proteína Citocromo C que funciona como um componente central da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias e, está envolvida no início da apoptose. A primeira mutação identificada nesse gene foi uma transição de base G para A, provocando a substituição de uma glicina por uma serina no resíduo 41 (G41S). Segundo Morison e colaboradores 2008, uma mutação nesse gene aumentou a atividade apoptótica (MORISON et al., 2008). Em estudo realizado com camundongos e leveduras, foi verificado o efeito de duas mutações nesse gene (G41S e Y48H), sendo encontrada redução do nível respiratório e aumento de apoptose (DE ROCCO et al., 2014).

O gene NPVF (neuropeptídeo precursor) é o único alvo transcricional no hipotálamo conhecido por ser regulado seletivamente por alterações na temperatura do ambiente. Foi demonstrado em experimentos realizados em camundongos que a expressão do gene NPVF no hipotálamo é regulada por alterações na temperatura ambiente independente do estado nutricional (JAROSLAWSKA et al., 2015). O RNU6 – 16P é um pseudogene e, não há informações sobre anotações do mesmo. O gene MIR148A codifica um micro RNA que está envolvido na regulação pós – transcricional da expressão de genes afetando tanto a estabilidade quanto a tradução dos RNAm. Estudos têm mostrado que esse gene é um indutor de diferenciação hepatocítica e, à desregulação do mesmo está associada com a presença de carcinoma hepatocelular (JUNG et al., 2016). Foi verificado que quando este gene está sobre – expresso atua como um supressor do tumor carcinoma espinocelular cutâneo (LUO et al., 2015). Assim, podemos afirmar com as informações disponíveis até o momento para esses genes nas laterais dos SNPs descritos que não é possível indagar uma relação entre eles e as características da doença estudada.

O gene mais próximo dos SNPs citados correlacionado com Leishmaniose é IL6 localizado na mesma região p15.3 do cromossomo 7, que codifica uma citocina que atua na inflamação e, maturação das células B. Foi demonstrado por Castellucci e colaboradores em 2006, através da genotipagem do polimorfismo IL6- 174 G/C, que o alelo C é mais comum em

pacientes com LM, e, esta mutação pode influenciar na susceptibilidade a doença na mucosa mas, não está relacionada com a forma cutânea (CASTELLUCCI et al., 2006).

No presente estudo foram identificados outros três SNPs no cromossomo 7, SNPs rs12707523, rs12707524 e rs7795945, ambos localizados em um gene já descrito, sendo um possível gene candidato relacionado com a evolução da doença. Esses SNPs estão em posições bem próximas (82486467, 82486615 e 82485050) localizados na região q21.11 no gene PCLO. Esse gene codifica a proteína citomatrix pré-sináptica piccolo, que faz parte do citoesqueleto pré-sináptico. Estudo realizado por Choi e colaboradores identificaram dois SNPs nesse gene e, foram associados com transtorno bipolar (CHOI et al., 2011). Além disso, variações nesse gene foram relacionadas com transtorno depressivo (HEK et al., 2009).

O SNP rs2299536 identificado com indicação de associação no cromossomo 7 está localizado na região q32.1 no gene GRM8, que codifica um receptor metabotrópico de glutamato 8 que é acoplado a proteína G. O papel desse gene foi implicado no desenvolvimento da dependência do álcool (LONG et al., 2015) e, SNPs identificados nesse gene foram associados com a doença Creutzfeldt-Jakob (SANCHEZ-JUAN et al., 2015).

No cromossomo 20 foi identificado o SNP rs4810120 com indicação de associação. Está localizado na região q13.32 no gene C20orf85 que é ortólogo ao gene LLC1. Esse gene está presente no epitélio pulmonar normal e foi visto que sua expressão gênica está reprimida em todas as linhagens de células de câncer de pulmão e adenocarcinoma pulmonar primário (HONG et al., 2007).

O SNP rs2732706 localizado no cromossomo 17 na região q21.31 apresentou indicação de associação com o fenótipo abordado, sendo que não há anotação gênica até o momento nessa posição. Os genes estruturalmente mais próximos desses SNPs, anotados no RefSeq são: KANSL1, KANSL1-AS1, LRRC37A e, ARL17A. O gene KANSL1 codifica uma proteína nuclear que está envolvida com a acetilação de histonas. Alterações nesse gene foram associadas com a síndrome de microdeleção do cromossomo 17q21.31 (MORENO-IGOIA et al., 2015). Não há informações no banco de genes do NCBI sobre KANSL1-AS1 RNA antisense 1. O gene LRRC37A codifica uma proteína rica em repetição de leucina contendo 37A e, a diminuição da expressão do mesmo foi associada com o haplótipo H1 do polimorfismo de inversão 17q21.31 (DE JONG et al., 2012). O gene ARL17A codifica um fator de ribosilação e, foi associado como um gene candidato de risco para a paralisia supranuclear progressiva (ALLEN et al., 2016).

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este é o primeiro estudo de associação por varredura genômica avaliando fenótipos clínicos em LT, onde foi verificado através do estudo de associação realizado com amostras de pacientes com LC e LM atendidos no CEMETRON infectados com *L. braziliensis*, a presença de fatores genéticos do hospedeiro humano que sugestivamente estão relacionados com a progressão da forma clínica cutânea para a forma mucosa, onde foram descritos 15 SNPs com uma provável indicação de associação com o fenótipo abordado.

Os resultados obtidos possibilitaram a identificação de três possíveis genes candidatos relacionados com a evolução da LT no banco de anotações gênicas utilizado para análise (RefSeq), sendo eles: C20orf85, GRM8 e PCLO.

Observamos no presente estudo que no cromossomo 4, numa região adjacente a três SNPs identificados nesse trabalho foram descritos quatro genes relacionados com a resposta imune em infecções pelo parasito *Leishmania*, tornando esses polimorfismos sugestões para trabalhos futuros.

Considerando-se a quantidade de dados brutos obtidos neste trabalho, após a elaboração e publicação de artigo científico, pretende-se disponibilizá-los para que outros pesquisadores interessados possam aprofundar as análises e traçar questões de interesse específico.

REFERÊNCIAS

- AFFYMETRIX. Data Sheet. GeneChip® Human Mapping 500K Array Set. 2006.
- AFFYMETRIX. GeneChip ® Mapping 500K Assay Manual. 2011.
- AJDARY, S.; GHAMILOUIE, M. M.; ALIMOHAMMADIAN, M. H.; RIAZI-RAD, F.; PAKZAD, S. R. Toll-like receptor 4 polymorphisms predispose to cutaneous leishmaniasis. **Microbes and Infection**, v. 13, n. 3, p. 226–231, 2011.
- ALLEN, M.; BURGESS, J. D.; BALLARD, T.; SERIE, D.; WANG, X.; YOUNKIN, C. S.; SUN, Z.; KOURI, N.; BAHETI, S.; WANG, C.; CARRASQUILLO, M. M.; NGUYEN, T.; LINCOLN, S.; MALPHRUS, K.; MURRAY, M.; GOLDE, T. E.; PRICE, N. D.; YOUNKIN, S. G.; SCHELLENBERG, G. D.; ASMANN, Y.; ORDOG, T.; CROOK, J.; DICKSON, D.; ERTEKIN-TANER, N. Gene expression, methylation and neuropathology correlations at progressive supranuclear palsy risk loci. **Acta Neuropathologica**, v. 132, n. 2, p. 1–15, 2016.
- ALMEIDA, L.; OLIVEIRA, J.; GUIMARÃES, L. H.; CARVALHO, E. M.; BLACKWELL, J. M.; CASTELLUCCI, L. Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: Role of COL1A1. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 30, p. 225–229, 2015.
- ALMEIDA, O. L. S.; SANTOS, J. B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos : uma revisão sistemática ten years : a systematic literature review. v. 86, n. 3, p. 497–506, 2011.
- ALVAR, J.; VÉLEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; DE BOER, M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ANDRADE, T. A. S. Perfil Epidemiológico Dos Casos Notificados De Leishmaniose Tegumentar Americana No Município De Igarassu (Pe) No Período De 2008 a 2010. n. 79, p. 5–15, 2011.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA DIFUSA (LCD). **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, p. 35–39, 2009.
- BARRAL, A.; COSTA, J. M.; BITTENCOURT, A. L.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. **International journal of dermatology**, v. 34, n. 7, p. 474–479, 1995.
- BARRETT, J. C.; FRY, B.; MALLER, J.; DALY, M. J. Haploview : analysis and visualization of LD and haplotype maps. v. 21, n. 2, p. 263–265, 2005.
- BASANO, S. de A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.

BHATTARAI, N. R.; VAN DER AUWERA, G.; KHANAL, B.; DE DONCKER, S.; RIJAL, S.; DAS, M. L.; URANW, S.; OSTYN, B.; PRAET, N.; SPEYBROECK, N.; PICADO, A.; DAVIES, C.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C. PCR and direct agglutination as Leishmania infection markers among healthy Nepalese subjects living in areas endemic for Kala-Azar. **Tropical Medicine and International Health**, v. 14, n. 4, p. 404–411, 2009.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA, B. BEPA. Boletim Epidemiológico Paulista. **Coordenadoria de Controle de Doenças**, v. 3, n. 36, p. 16–22, 2006.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ministério da Saúde**, 2007.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Ministério da Saúde**, 2010.

BRASIL. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Leishmaniose Tegumentar Americana.** **Ministério da Saúde/SVS.** Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>>. Acesso em: 5 ago. 2014.

BROOKES, A. J. The essence of SNPs. **Gene**, v. 234, n. 2, p. 177–186, 1999.

BRUSTOLONI, Y. M.; CUNHA, R. V.; DORVAL, M. E.; OSHIRO, E. T.; PONTES, E. R. J. C.; OLIVEIRA, A. L. L.; HILLEBRAND, L.; RIBEIRO, L. F. Comparison of conventional methods for diagnosis of visceral leishmaniasis in children of the Center-West Region of Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 106–9, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17625737>>.

BRUXEL, E. M.; SALATINO-OLIVEIRA, A.; AKUTAGAVA-MARTINS, G. C.; TOVO-RODRIGUES, L.; GENRO, J. P.; ZENI, C. P.; POLANCZYK, G. V.; CHAZAN, R.; SCHMITZ, M.; ARCOS-BURGOS, M.; ROHDE, L. A.; HUTZ, M. H. LPHN3 and attention-deficit/hyperactivity disorder: A susceptibility and pharmacogenetic study. **Genes, Brain and Behavior**, v. 14, n. 5, p. 419–427, 2015.

BUMGARNER, R. DNA microarrays: Types, Applications and their future. **Curr Protoc Mol Biol.**, v. 6137, n. 206, p. 1–17, 2013.

CABRERA, M. A. A.; PAULA, A. A.; CAMACHO, L. A. B.; MARZOCHI, M. C. A.; XAVIER, S. C.; SILVA, A. V. M. Da; JANSEN, A. M. Canine visceral leishmaniasis in Barra de Guaratiba, Rio de Janeiro, Brazil: assessment of risk factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 2, p. 79–83, 2003.

CABRERA, M.; SHAW, M. A.; SHARPLES, C.; WILLIAMS, H.; CASTES, M.; CONVIT, J.; BLACKWELL, J. M. Polymorphism in tumor necrosis factor genes associated with mucocutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1259–64, 1995.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: Conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SUPPL. 1, p. 64–71, 2009.

CANTANHÊDE, L. M.; DA SILVA JÚNIOR, C. F.; ITO, M. M.; FELIPIN, K. P.; NICOLETE, R.; SALCEDO, J. M. V.; PORROZZI, R.; CUPOLILLO, E.; FERREIRA, R. de G. M. Further Evidence of an Association between the Presence of Leishmania RNA Virus 1 and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. 1–11, 2015.

CASTELLUCCI, L. C.; DE ALMEIDA, L. F.; JAMIESON, S. E.; FAKIOLA, M.; DE CARVALHO, E. M.; BLACKWELL, J. M. Host genetic factors in American cutaneous leishmaniasis: A critical appraisal of studies conducted in an endemic area of Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 3, p. 279–288, 2014.

CASTELLUCCI, L.; JAMIESON, S. E.; ALMEIDA, L.; OLIVEIRA, J.; HENRIQUE, L.; LESSA, M.; FAKIOLA, M.; RIBEIRO, A.; JESUS, D.; MILLER, E. N.; CARVALHO, E. M.; BLACKWELL, J. M. Infection , Genetics and Evolution Wound healing genes and susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. v. 12, p. 1102–1110, 2012.

CASTELLUCCI, L.; JAMIESON, S. E.; MILLER, E. N.; DE ALMEIDA, L. F.; OLIVEIRA, J.; MAGALHÃES, A.; GUIMARÃES, L. H.; LESSA, M.; LAGO, E.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; BLACKWELL, J. M. FLI1 polymorphism affects susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Genes and immunity**, v. 12, n. 7, p. 589–94, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/gene.2011.37>>.

CASTELLUCCI, L.; JAMIESON, S. E.; MILLER, E. N.; MENEZES, E.; OLIVEIRA, J.; MAGALHÃES, A.; GUIMARÃES, L. H.; LESSA, M.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; BLACKWELL, J. M. CXCR1 and SLC11A1 polymorphisms affect susceptibility to cutaneous leishmaniasis in Brazil: a case-control and family-based study. **BMC medical genetics**, v. 11, p. 10, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2823618&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CASTELLUCCI, L.; MENEZES, E.; OLIVEIRA, J.; MAGALHAES, a; GUIMARAES, L. H.; LESSA, M.; RIBEIRO, S.; REALE, J.; NORONHA, E. F.; WILSON, M. E.; DUGGAL, P.; BEATY, T. H.; JERONIMO, S.; JAMIESON, S. E.; BALES, a; BLACKWELL, J. M.; DE JESUS, a R.; CARVALHO, E. M. IL6 -174 G/C promoter polymorphism influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. **J Infect Dis**, v. 194, n. 4, p. 519–527, 2006.

CHAUDHURI, J. D. Genes arrayed out for you: the amazing world of microarrays. **Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research**, v. 11, n. 2, p. RA52-62, 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668645>>.

CHEN, X.; SULLIVAN, P. F. Single nucleotide polymorphism genotyping: biochemistry, protocol, cost and throughput. **The Pharmacogenomics Journal**, v. 3, n. 2, p. 77–96, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj.tpj.6500167>>.

CHOI, K. H.; HIGGS, B. W.; WENDLAND, J. R.; SONG, J.; MCMAHON, F. J.; WEBSTER, M. J. Gene expression and genetic variation data implicate PCLO in bipolar disorder. **Biological Psychiatry**, v. 69, n. 4, p. 353–359, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.042>>.

CONSORTIUM, W. T. T. C. C. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven

common diseases and 3,000 shared controls. **Nature**, v. 447, n. 7145, p. 661–78, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2719288&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

CORDEIRO, G. M.; ELIOTT, F.; MCINTYRE, C. L.; CASU, R. E.; HENRY, R. J. Characterisation of single nucleotide polymorphisms in sugarcane ESTs. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 113, n. 2, p. 331–343, 2006.

CORRÊA, J. R.; BRAZIL, R. P.; SOARES, M. J. Leishmania (Viannia) lainsoni (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent Leishmania of the Viannia subgenus - A mini review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 6, p. 587–592, 2005.

COUPPIÉ, P.; CLYTI, E.; SAINTE-MARIE, D.; DEDET, J. P.; CARME, B.; PRADINAUD, R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to Leishmania guyanensis: Case of a patient with 425 lesions. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 558–560, 2004.

COVAS, C. de J. F.; CARDOSO, C. C.; GOMES-SILVA, A.; OLIVEIRA, J. R. S.; DA-CRUZ, A. M.; MORAES, M. O. Candidate gene case-control and functional study shows macrophage inhibitory factor (MIF) polymorphism is associated with cutaneous leishmaniasis. **Cytokine**, v. 61, n. 1, p. 168–172, 2013.

CUPOLILLO, E.; MEDINA-ACOSTA, E.; NOYES, H.; MOMEN, H.; GRIMALDI G., J. A revised classification for Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology Today**, v. 16, n. 4, p. 142–144, 2000.

DARIE, H.; LANOTTES, G.; MILLETI, P.; HOUINZ, R.; MONDOR, H. outside Brazil ~ pGii & Gq. n. 1990, p. 476–477, 1995.

DE ARAUJO, F. J.; DA SILVA, L. D.; MESQUITA, T. G.; PINHEIRO, S. K.; VITAL WDE, S.; CHRUSCIK-TALHARI, A.; GUERRA, J. A.; TALHARI, S.; RAMASAWMY, R. Polymorphisms in the TOLLIP Gene Influence Susceptibility to Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania guyanensis in the Amazonas State of Brazil. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 6, p. e0003875, 2015.

DE JONG, S.; CHEPELEV, I.; JANSON, E.; STRENGMAN, E.; VAN DEN BERG, L. H.; VELDINK, J. H.; OPHOFF, R. A. Common inversion polymorphism at 17q21.31 affects expression of multiple genes in tissue-specific manner. **BMC Genomics**, v. 13, n. 1, p. 458, 2012. Disponível em: <BMC Genomics>.

DE ROCCO, D.; CERQUA, C.; GOFFRINI, P.; RUSSO, G.; PASTORE, A.; MELONI, F.; NICCHIA, E.; MORAES, C. T.; PECCI, A.; SALVIATI, L.; SAVOIA, A. Mutations of cytochrome c identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1842, n. 2, p. 269–274, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.12.002>>.

DESJEUX, P. Leishmaniasis. Public Health Aspects and Control. **Elsevier Science Inc.**, 1996.

DEVALLA, H. D.; GÉLINAS, R.; ABURAWI, E. H.; BEQQALI, A.; GOYETTE, P.; FREUND, C.; CHAIX, M.; TADROS, R.; JIANG, H.; LE BÉCHEC, A.; MONSHOUWER-KLOOTS, J. J.; ZWETSLOOT, T.; KOSMIDIS, G.; LATOUR, F.; ALIKASHANI, A.;

HOEKSTRA, M.; SCHLAEPFER, J.; MUMMERY, C. L.; STEVENSON, B.; KUTALIK, Z.; DE VRIES, A. A.; RIVARD, L.; WILDE, A. A.; TALAJIC, M.; VERKERK, A. O.; AL-GAZALI, L.; RIOUX, J. D.; BHUIYAN, Z. A.; PASSIER, R. TECRL , a new life-threatening inherited arrhythmia gene associated with overlapping clinical features of both LQTS and CPVT. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 12, p. e201505719, 2016. Disponível em: <<http://embomolmed.embopress.org/content/early/2016/10/24/emmm.201505719.abstract>>.

ESPIR, T. T.; GUERREIRO, T. S.; NAIFF, M. de F.; FIGUEIRA, L. de P.; SOARES, F. V.; SILVA, S. S. da; FRANCO, A. M. R. Experimental Parasitology Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 167, p. 1–6, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.010>>.

ESTEVEZ, G. H. Metodos estatísticos para a análise de dados de cDNA microarray em um ambiente computacional integrado. p. 1–181, 2007.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; LIMA, A. P. C. A. Toll-like receptors in Leishmania infections: Guardians or promoters? **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of Leishmania donovani promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 411–420, 2006.

GARCIA, F. C. B.; MEDEIROS, Â. C. R.; SILVA, S.; ROSELINO, A. M. F.; CHOCIAY, M. F. PP014 - Métodos subsidiários para o diagnóstico da Leishmaniose tegumentar americana (LTA): comparação dos resultados do sequenciamento de DNA e da PCR-RFLP para determinação da PCR-RFLP for identification of leishmania species in skin samples . *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. Supl 3, p. 339–344, 2005.

GERGEN, J. P.; STERN, R. H.; WENSINK, P. C. Filter replicas and permanent collections of recombinant DNA plasmids. **Nucleic Acids Research**, v. 7, n. 8, p. 2115–2136, 1979.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. de L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=20377337>.

GRIMALDI, G. J.; MCMAHON-PRATT, D. Monoclonal antibodies for the identification of New World Leishmania species. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 1, p. 37–42, 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734946>>.

GRUNSTEIN, M.; HOGNESS, D. S. Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 72, n. 10, p. 3961–5, 1975. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=433117&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

HAHN, W. O.; HARJU-BAKER, S.; ERDMAN, L. K.; KRUDSOOD, S.; KAIN, K. C.; WURFEL, M. M.; LILES, W. C. A common TLR1 polymorphism is associated with higher

parasitaemia in a Southeast Asian population with *Plasmodium falciparum* malaria. **Malaria Journal**, v. 15, n. 1, p. 12, 2016. Disponível em: <<http://www.malariajournal.com/home/%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed13&NEWS=N&AN=20160021758%5Cnhttp://www.malariajournal.com/content/15/1/12>>.

HEK, K.; MULDER, C. L.; LUIJENDIJK, H. J.; VAN DUIJN, C. M.; HOFMAN, A.; UITTERLINDEN, A. G.; TIEMEIER, H. The PCLO gene and depressive disorders: Replication in a population-based study. **Human Molecular Genetics**, v. 19, n. 4, p. 731–734, 2009.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 0140–6736 (Print), p. 1191–1199, 1999.

HONG, K.-M.; YANG, S.-H.; CHOWDHURI, S. R.; PLAYER, A.; HAMES, M.; FUKUOKA, J.; MEERZAMAN, D.; DRACHEVA, T.; SUN, Z.; YANG, P.; JEN, J. Inactivation of LLC1 gene in nonsmall cell lung cancer Kyeong-Man. **Clinical Research**, v. 147, n. 1, p. 39–44, 2007.

HU, G.; FAN, Y.; WANG, L.; YAO, R.; HUANG, X.; SHEN, Y.; YU, Y.; GU, X. Copy number variations in 119 Chinese children with idiopathic short stature identified by the custom genome-wide microarray. **Molecular Cytogenetics**, v. 9, n. 1, p. 16, 2016. Disponível em: <<http://www.molecularcytogenetics.org/content/9/1/16>>.

ITO, M. M. Correlação entre a presença de Leishmania RNA Vírus 1 e as características clínicas da leishmaniose de mucosa nasal Correlação entre a presença de Leishmania RNA Vírus 1 e as características clínicas da leishmaniose de mucosa nasal. **Dissertação**, 2014.

IVES, A.; RNET, C.; PREVEL, F.; RUZZANTE, G.; FUERTES-MARRACO, S.; SCHUTZ, F.; ZANGGER, H.; REVAZ-BRETON, M.; LYE, L.; HICKERSON, S. M.; BEVERLEY, S. M.; ACHA-ORBEA, H.; LAUNOIS, P.; FASEL, N.; MASINA, S. Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. n. February, p. 775–778, 2011.

JAROSLAWSKA, J.; CHABOWSKA-KITA, A.; KACZMAREK, M. M.; KOZAK, L. P. Npvf: Hypothalamic Biomarker of Ambient Temperature Independent of Nutritional Status. **PLoS Genetics**, v. 11, n. 6, p. 1–23, 2015.

JAYAKUMAR, A.; CASTILHO, T. M.; PARK, E.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; BLACKWELL, J. M.; MCMAHON-PRATT, D. TLR1/2 activation during Heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T cell responses providing protection against Leishmania (Viannia). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, 2011.

JOSÉ, F. F.; DA SILVA, I. M.; ARAÚJO, M. I.; ALMEIDA, R. P.; BACELLAR, O.; CARVALHO, E. M. Avaliação do poder sensibilizante da reação de Montenegro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, n. 6, p. 537–542, 2001.

JUNG, K. H.; ZHANG, J.; ZHOU, C.; SHEN, H.; GAGEA, M.; RODRIGUEZ-AGUAYO, C.; LOPEZ-BERESTEIN, G.; SOOD, A. K.; BERETTA, L. Differentiation therapy for hepatocellular carcinoma: Multifaceted effects of miR-148a on tumor growth and phenotype and liver fibrosis. **Hepatology**, v. 63, n. 3, p. 864–879, 2016.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2608>>.

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmania (Viannia) naiffi sp. n., a parasite of the armadillo, Dasypus novemcinctus (L.) in Amazonian Brazil. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, v. 64, p. 3–9, 1989.

LENNON, G. G.; LEHRACH, H. Hybridization analyses of arrayed cDNA libraries. **Trends in Genetics**, v. 7, n. 10, p. 314–317, 1991.

LESSA, M. M.; LESSA, H. A.; CASTRO, T. W. N.; OLIVEIRA, A.; SCHERIFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E. M. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 73, n. 6, p. 843–847, 2007.

LIAO, P. Y.; LEE, K. H. From SNPs to functional polymorphism: The insight into biotechnology applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 49, n. 2, p. 149–158, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2009.12.021>>.

LONG, E. C.; ALIEV, F.; WANG, J. C.; EDENBERG, H. J.; NURNBERGER JR., J.; HESSELBROCK, V.; PORJESZ, B.; DICK, D. M. Further Analyses of Genetic Association Between GRM8 and Alcohol Dependence Symptoms Among Young Adults. **J Stud Alcohol Drugs**, v. 76, n. 3, p. 414–418, 2015.

LUO, Q.; LI, W.; ZHAO, T.; TIAN, X.; LIU, Y.; ZHANG, X. Role of miR-148a in cutaneous squamous cell carcinoma by repression of MAPK pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 47–54, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.abb.2015.07.022>>.

MARTINS, G. A. de S. M.; LIMA, M. D. de. Leishmaniose: do diagnóstico ao tratamento. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA, Centro Científico Conhecer**, v. 1, p. 2556–2569, 2013.

MCGEACHIE, M. J.; CLEMMER, G. L.; LASKY-SU, J.; DAHLIN, A.; RABY, B. A.; WEISS, S. T. Joint GWAS Analysis: Comparing similar GWAS at different genomic resolutions identifies novel pathway associations with six complex diseases. **Genomics Data**, v. 2, p. 202–211, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gdata.2014.04.004>>.

MORENO-IGOA, M.; HERNÁNDEZ-CHARRO, B.; BENGEOA-ALONSO, A.; PÉREZ-JUANA-DEL-CASAL, A.; ROMERO-IBARRA, C.; NIEVA-ECHEBARRIA, B.; RAMOS-ARROYO, M. A. KANSL1 gene disruption associated with the full clinical spectrum of 17q21.31 microdeletion syndrome. **BMC medical genetics**, v. 16, n. 1, p. 68, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4593202&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MORISON, I. M.; CRAMER BORDÉ, E. M.; CHEESMAN, E. J.; CHEONG, P. L.; HOLYOAKE, A. J.; FICHELSON, S.; WEEKS, R. J.; LO, A.; DAVIES, S. M. K.; WILBANKS, S. M.; FAGERLUND, R. D.; LUDGATE, M. W.; DA SILVA TATLEY, F. M.; COKER, M. S. A.; BOCKETT, N. A.; HUGHES, G.; PIPPIG, D. A.; SMITH, M. P.; CAPRON, C.; LEDGERWOOD, E. C. A mutation of human cytochrome c enhances the intrinsic apoptotic pathway but causes only thrombocytopenia. **Nature Genetics**, v. 40, n. 4, p.

387–389, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18345000%5Cnhttp://www.nature.com/ng/journal/v40/n4/pdf/ng.103.pdf>>.

NAKAOKA, H.; INOUE, I. Meta-analysis of genetic association studies: methodologies, between-study heterogeneity and winner's curse. **Journal of human genetics**, v. 54, n. 11, p. 615–623, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2009.95>>.

NASCIMENTO, C. D. Identificação dos genes humanos candidatos à participação na patogênese da leishmaniose tegumentar americana causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Universidade Federal da Bahia. Monografia**, 2015.

NOMME, J.; SU, Y.; LAVIE, A. Elucidation of the specific function of the conserved threonine triad responsible for human l-Asparaginase autocleavage and substrate hydrolysis. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 13, p. 2471–2485, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2014.04.016>>.

OLAZAR, M. R. R. UMA METODOLOGIA PARA A DESCOBERTA DE MARCADORES GENÉTICOS EM ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO Margarita. **Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Elétrica**, 2013.

OPAS, P. A. H. O.; WHO, W. H. O. **LEISHMANIASIS. Epidemiological Report in the Americas**. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754>. Acesso em: 5 out. 2016.

PANDEY, S. P.; CHANDEL, H. S.; SRIVASTAVA, S.; SELVARAJ, S.; JHA, M. K.; SHUKLA, D.; EBENSEN, T.; GUZMAN, C. A.; SAHA, B. Pegylated Bisacycloxypropylcysteine, a Diacylated Lipopeptide Ligand of TLR6, Plays a Host-Protective Role against Experimental *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 193, n. 7, p. 3632–3643, 2014. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1400672>>.

PEREIRA, L. C. Busca de genes associados à resposta ao teste de Montenegro para antígenos de *Leishmania*. **Tese de doutorado. USP.**, 2012.

PETZL-ERLER, M. L.; BELICH, M. P.; QUEIROZ-TELLES, F. Association of Mucosal Leishmaniasis with HLA. **Human Immunology**, v. 32, n. 4, p. 254–260, 1991.

PIRES, A. M. S.; COSTA, G. C.; GONÇALVES, E. G. R.; ALVIM, A. de C.; NASCIMENTO, F. R. F. Aspectos Imunológicos e Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana : UMA REVISÃO . p. 30–39, 2012.

PRUITT, K. Chapter 18: The Reference Sequence (RefSeq) Database. **The NCBI Handbook**, n. Md, p. 1–22, 2012.

PURCELL, S. PLINK (1.07) Documentation. p. 2–293, 2010.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M. A. R.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; DE BAKKER, P. I. W.; DALY, M. J.; SHAM, P. C. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.

RAMASAWMY, R.; MENEZES, E.; MAGALHÃES, A.; OLIVEIRA, J.; CASTELLUCCI, L.; ALMEIDA, R.; ROSA, M. E. A.; GUIMARÃES, L. H.; LESSA, M.; NORONHA, E.; WILSON, M. E.; JAMIESON, S. E.; KALIL, J.; BLACKWELL, J. M.; CARVALHO, E. M.; JESUS, A. R. de. The -2518 bp promoter polymorphism at CCL2/MCP1 influences susceptibility to mucosal but not localized cutaneous leishmaniasis in Brazil. *v. 100, n. 2, p. 130–134, 2012.*

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N. De; MARZAL, C.; MEDICINA, I. De; SÃO, T. De; PAULO, U. D. S.; ENÉAS, A.; AGUIAR, D. C.; SP, S. P. Antimoniais Empregados No Tratamento Da Leishmaniose: Estado Da Arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 9, p. 581–596, 2007.

RESENDE, M. D. V.; SILVA, F. F.; LOPES, P. S.; AZEVEDO, C. F. **Seleção genômica ampla (gws) via modelos mistos (reml/blup), inferência bayesiana (mcmc), regressão aleatória multivariada e estatística espacial.** [s.l.: s.n.]

ROBINSON, J. T.; THORVALDSDÓTTIR, H.; WINCKLER, W.; GUTTMAN, M.; LANDER, E. S.; GETZ, G.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer. **Nature Biotechnology**, v. 29, n. 1, p. 24–26, 2012.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 209, n. 1, p. 1–7, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007646>>.

SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 8, p. 383–391, 2009.

SALHI, A.; RODRIGUES, V.; SANTORO, F.; DESSEIN, H.; ROMANO, A.; CASTELLANO, L. R.; SERTORIO, M.; RAFATI, S.; CHEVILLARD, C.; PRATA, A.; ALCAÏS, A.; ARGIRO, L.; DESSEIN, A. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 9, p. 6139–6148, 2008.

SAMARANAYAKE, N.; FERNANDO, S. D.; NETHTHIKUMARA, N. F.; RODRIGO, C.; KARUNAWEEERA, N. D.; DISSANAYAKE, V. H. W. Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: a case control study from Sri Lanka and a systematic review. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 292, 2016. Disponível em: <<http://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-016-1626-8>>.

SANCHEZ-JUAN, P.; BISHOP, M. T.; KOVACS, G. G.; CALERO, M.; AULCHENKO, Y. S.; LADOGANA, A.; BOYD, A.; LEWIS, V.; PONTO, C.; CALERO, O.; POLEGGI, A.; CARRACEDO, Á.; VAN DER LEE, S. J.; STRÖBEL, T.; RIVADENEIRA, F.; HOFMAN, A.; HAÏK, S.; COMBARROS, O.; BERCIANO, J.; UITTERLINDEN, A. G.; COLLINS, S. J.; BUDKA, H.; BRANDEL, J. P.; LAPLANCHE, J. L.; POCCHIARI, M.; ZERR, I.; KNIGHT, R. S. G.; WILL, R. G.; VAN DUIJN, C. M. A genome wide association study links glutamate receptor pathway to sporadic Creutzfeldt-Jakob disease risk. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–14, 2015.

SANTORO, A. Identificação de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) no gene Nove-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED) em Eucalyptus Andreia Santoro Identificação de Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) no gene Nove-cis-epoxicarotenóide dioxigenase (NCED). **Dissertação de Mestrado.**, 2010.

SATO, Y.; INOKUCHI, M.; TAKAGI, Y.; OTSUKI, S.; FUJIMORI, Y.; YANAKA, Y.; KOBAYASHI, K.; HIGUCHI, K.; KOJIMA, K.; KAWANO, T. Relationship between expression of IGFBP7 and clinicopathological variables in gastric cancer. **Journal of clinical pathology**, v. 68, n. 10, p. 795–801, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26043748>>.

SCOTT, P. Impaired macrophage leishmanicidal activity at cutaneous temperature. **Parasite immunology**, v. 7, n. 3, p. 277–288, 1985.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Publishing Group**, 2016.

SHAFFER, J. P. Multiple hypothesis testing. **Annual Reviews of Psychology**, v. 46, p. 561–584, 1995.

SHIRIAN, S.; ORYAN, A.; HATAM, G. R.; PANAHI, S.; DANESHBOD, Y. Comparison of conventional, molecular, and immunohistochemical methods in diagnosis of typical and atypical cutaneous leishmaniasis. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 138, n. 2, p. 235–240, 2014.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; SHAW, J. J.; GARCEZ, L. M.; SOUZA, A. A.; BRAGA, R. R.; ISHIKAWA, E. A. LEISHMANIOSE CUTÂNEA EXPERIMENTAL : I - SOBRE A SUSCEPTIBILIDADE DO PRIMATA CEBUS APPELLA (CEBIDAE) A INFECÇÃO PELA LEISHMANIA (VIANNIA) LAINSONI. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, n. 3, p. 125–130, 1989.

SILVEIRA, F. T.; MULLER, S. R.; DE SOUZA, A. a. a.; LAINSON, R.; GOMES, C. M. C.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E. P. Revisão sobre a patogenia da leishmaniose tegumentar americana na Amazônia, com nfase à doença causada por Leishmania (V.) braziliensis e Leishmania (L.) amazonensis. **Revista Paraense de Medicina**, v. 22, n. 1, p. 9–20, 2008.

SILVEIRA, F. T.; Y, I. E. A.; AAA, D. E. S.; LAINSON, R. AN OUTBREAK OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS AMONG SOLDIERS IN BELÉM, PARÁ STATE, BRAZIL, CAUSED BY LEISHMANIA (VIANNIA) UNDENBERGI N. SP. A NEW LEISHMANIAL PARASITE OF MAN IN THE AMAZON REGION. **Parasite**, p. 43–50, 2002.

SOUSA, R. S. O polimorfismo genético intraespecífico e o comportamento biológico da infecção por Leishmania braziliensis. **Tese de doutorado. Universidade Federal da Bahia**, 2012.

SOUTHERN, E. Southern blotting. **Nature protocols**, v. 1, n. 2, p. 518–525, 2006.

SOUZA, M. de A. Quantificação de mediadores dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg na resposta imune contra Leishmaniose Tegumentar Americana ativa e após cura clínica. **Tese de doutorado.**, v. 1, p. 1–135, 2014.

STAPPERS, M. H. T.; OOSTING, M.; LOANA, M.; REIMNITZ, P.; MOUTON, J. W.; NETEA, M. G.; GYSSENS, I. C.; JOOSTEN, L. A. B. Genetic Variation in the Inhibitory Toll-Like Receptor 10 Influences Susceptibility to Complicated Skin and Skin Structure Infections 1 Accepted. **Journal of Infectious Diseases**, n. 1;212(9):1491-9, 2015.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; RODRIGUES, J. C. F.; CREPALDI, P. H.; PIMENTA, P. F. P.; DE SOUZA, W. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 8–11, 2013.

THORVALDSDÓTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178–192, 2013.

TURNER, S. D. qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. **Department of Public Health Sciences, University of Virginia School of Medicine**, 2014.

URDAPILLETA, A. A. A. ESTUDO DO COMPORTAMENTO CLÍNICO, EFEITO DE DROGAS IN VITRO E IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LEISHMANIA ISOLADAS DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA QUE NÃO RESPONDERAM AO TRATAMENTO. **Tese de doutorado. Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília**, 2011.

VERGEL, C.; PALACIOS, R.; CADENA, H.; POSSO, C. J.; VALDERRAMA, L.; PEREZ, M.; WALKER, J.; TRAVI, B. L.; SARAVIA, N. G. Evidence for leishmania (viannia) parasites in the skin and blood of patients before and after treatment. **J Infect Dis**, v. 194, n. 4, p. 503–511, 2006.

WHO, W. H. O. **Leishmaniasis. Epidemiological situation**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

ZHANG, R.; YAO, F.; GAO, F.; ABOU-SAMRA, A. B. Nr4a2, a Novel Nutritionally-Regulated Adipose and Cardiac-Enriched Gene. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9, p. 1–7, 2012.

ZHOU, R.; NIWA, S.; HOMMA, N.; TAKEI, Y.; HIROKAWA, N. KIF26A Is an Unconventional Kinesin and Regulates GDNF-Ret Signaling in Enteric Neuronal Development. **Cell**, v. 139, n. 4, p. 802–813, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2009.10.023>>.

ANEXO A



**CENTRO DE PESQUISA EM
MEDICINA TROPICAL / CEPEM**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM RONDÔNIA

Pesquisador: Ricardo de Godoi Mattos Ferreira

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 1

CAAE: 54386716.1.0000.0011

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ NOROESTE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.468.337

Apresentação do Projeto:

O projeto tem a finalidade de caracterizar a fisiopatologia e epidemiologia da Leishmaniose tegumentar, doença negligenciada com grande importância epidemiológica no Estado de Rondônia. Os pacientes avaliados serão os pacientes atendidos no hospital de referência para ambulatório de leishmaniose do Estado, hospital CEMETRON. A pesquisa seguirá três eixos: 1) Análise clínica e epidemiológica da Leishmaniose; 2) Avaliação dos fatores relacionados à patogenia da Leishmaniose; 3) Avaliação dos fatores de virulência do parasito (expressão gênica, dosagem de citocinas).

Objetivo da Pesquisa:

Investigar os aspectos clínicos e epidemiológicos da LTA a partir de dados coletados de pacientes atendidos no Hospital de Medicina Tropical de Rondônia. Avaliar a existência de mecanismos genéticos humanos responsáveis pela progressão da leishmaniose cutânea para a forma mucosa em pacientes com LTA utilizando a metodologia de microarranjos de DNA. Analisar a expressão gênica comparativa de genes de virulência do parasita em amostras coletadas de lesão de pacientes com LTA. Analisar o perfil das citocinas e quimiocinas expressas em células sanguíneas isoladas de pacientes com LTA.

Endereço: Avenida Guaporé 215

Bairro: Lagoa

CEP: 76.812-329

UF: RO

Município: PORTO VELHO

Telefone: (69)3216-5442

Fax: (69)3219-6012

E-mail: cepesquisacepem@yahoo.com.br



**CENTRO DE PESQUISA EM
MEDICINA TROPICAL / CEPEM**



Continuação do Parecer: 1.400.337

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O risco ao participante voluntário será mínimo. Existe um desconforto, e será de leve sensação dolorosa no momento da coleta de sangue e do aspirado da lesão, justificada para que se possa realizar os procedimentos necessários.

O voluntário participante da pesquisa será beneficiado diretamente com a realização dos exames de biologia molecular disponibilizados ao médico responsável no prazo máximo de sete dias após a coleta.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de extrema relevância e importância clínica e epidemiológica no Estado de Rondônia, uma vez que a Leishmaniose Tegumentar apresenta-se com característica complexa nessa região. Mesmo com vertentes de atuação distintas, todas trarão respostas benéficas não somente à sociedade científica, mas aos pacientes que em sua maioria tem condições sociais econômicas e culturais desfavoráveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados. Conforme a resolução CNS. 466/12.

Recomendações:

Como se trata de um projeto de perfil clínico é importante estreitar a comunicação com o Comitê de Ética em Pesquisa, com o desenvolvimento de relatórios constantes, relatando o andamento do projeto executado com vertente diferente.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido é um documento de proteção ao participante da pesquisa, com garantia de sigilo e autorização para execução da pesquisa. Dessa forma uma via do TCLE deve sempre ser entregue ao participante ou seu responsável legal.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendência, nem lista de Inadequações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto em questão atende aos requisitos definidos pelos princípios bioéticos para pesquisa em seres humanos, exigidos pelas resoluções do CNS. Não há impedimento ético para a realização do estudo.

Informações ao pesquisador:

Endereço: Avenida Guaporé 215		CEP: 78.812-329
Bairro: Legião		
UF: RO	Município: PORTO VELHO	
Telefone: (69)3218-5442	Fax: (69)3219-8012	E-mail: cepesquiacepam@yahoo.com.br



CENTRO DE PESQUISA EM MEDICINA TROPICAL / CEPEM



Continuação do Parecer: 1.460.337

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 466/12) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado.
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS 466/12), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa que requeiram ação imediata.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS 466/12). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.
- Relatórios parcial e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente em seis meses após o início do estudo e ao término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PE_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_676969.pdf	14/03/2016 09:18:43		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_projeto_2016.pdf	14/03/2016 09:18:13	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Aceito
Outros	TERMO_DE_COMPROMISSO_publicacao_dos_resultados.pdf	10/03/2016 18:25:20	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Aceito
Outros	DECLARACAO_iniciar_pesquisa_apos_aprovacao.pdf	10/03/2016 18:24:41	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Aceito
Outros	DECLARACAO_nova_autorizacao_CEP.pdf	10/03/2016 18:23:52	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Aceito
Outros	JUSTIFICATIVA_armazenamento_de_a_mostra.pdf	10/03/2016 18:23:03	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Aceito

Endereço: Avenida Guaporé 215
Bairro: Lagoa CEP: 76.812-329
UF: RO Município: PORTO VELHO
Telefone: (69)3218-5442 Fax: (69)3219-6012 E-mail: cepesquacepem@yahoo.com.br



**CENTRO DE PESQUISA EM
MEDICINA TROPICAL / CEPEM**



Continuação do Parecer: 1.460.337

Outros	Termo_de_compromisso_Biorepositorio.pdf	10/03/2016 18:22:14	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Acelto
Outros	Carta_de_colaboracao_cemetron.pdf	10/03/2016 18:20:26	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP_II.docx	10/03/2016 18:19:41	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_projeto_2015.pdf	10/03/2016 18:16:11	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracao_Uso_Material_Biologico.pdf	10/03/2016 18:15:50	Ricardo de Godoi Mattos Ferreira	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO VELHO, 29 de Março de 2016

Assinado por:
FLÁVIA SERRANO BATISTA
(Coordenador)

Endereço: Avenida Guaporé 215

Bairro: Lagoa

CEP: 76.812-329

UF: RO

Município: PORTO VELHO

Telefone: (69)3218-5442

Fax: (69)3219-8012

E-mail: cepesquicapepm@yahoo.com.br

APÊNDICE A

Tabela 2 – Valor do Controle de Qualidade – *QC call rate* e *call rate* das amostras geradas pelo GTC da Affymetrix e identificação do tipo de amostra.

Número do Chip	QC <i>Call rate</i>	<i>Call rate</i>	Forma Clínica
102_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	82.50	92,4651	LC
106_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	82.22	91,98049	LC
126_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	87.37	94,10477	LC
141_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.18	95.48615	LC
142_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	86.05	94.20917	LC
145_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.34	95.69496	LC
149_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	91.17	95.09464	LC
152_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.91	95.73196	LC
173_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	84.48	92.61587	LC
188_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.60	95.82702	LM
194_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	87.56	94.8687	LM
195_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	84.27	93.27306	LC
219_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.50	92.02061	LC
222_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.30	93.56796	LC
23_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.99	93.887	LM
270_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	80.09	88.04163	LC
279_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	81.61	87.26563	LC
281_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	81.41	89.71714	LC
301_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.89	92.29759	LC
314_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.45	93.84805	LC
362_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	81.07	90.31862	LC
378_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	92.21	96.78105	LC
39_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	87.61	95.05374	LM
416_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	90.96	96.16048	LM
42_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.93	96.24268	LC
47_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.71	95.06192	LC
51_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.99	95.59834	LC
566_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	80.20	89.38095	LM
617_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	84.08	91.80558	LM
84_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.19	95.63808	LM
93_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	84.23	93.111	LC
M 08_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	87.84	95.05881	LM
M 13_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.77	86.59948	LM
M 20_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.55	95.51381	LM
M 320_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	87.47	94.08179	LM
M 343_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.86	95.37357	LM
M 346_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.15	94.73508	LM
M 360_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.25	95.49005	LM
M04_(Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.26	95.54693	LM

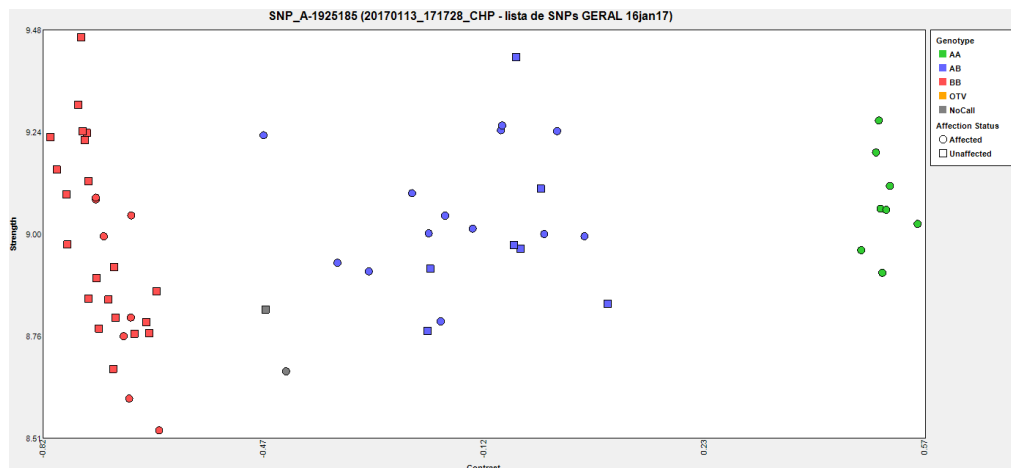
Continuação na página 61.

(Continuação)

Número do Chip	QC <i>Call rate</i>	<i>Call rate</i>	Forma Clínica
M05_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.52	96.15192	LM
M15_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	86.99	92.67469	LM
M21_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	90.94	96.40903	LM
M30_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	91.40	96.62601	LM
M31_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	88.12	95.58354	LM
M32_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.62	95.91701	LM
M35_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	89.77	96.11763	LM
M37_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	90.00	96.14568	LM
M40_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.03	93.80325	LM
M43_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	82.99	90.61547	LM
M45_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	83.46	93.57224	LM
291_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	83.36	89.50444	LC
345_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	83.86	92.34629	LC
379_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	84.60	92.95011	LC
392_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.01	93.2637	LC
501_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	83.56	91.77987	LM
535_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.48	92.96101	LM
135_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	81.57	90.79194	LC
235_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	81.96	84.81412	LC
484rep_ (Mapeamento250K_Nsp).CEL	85.01	94.04478	LM

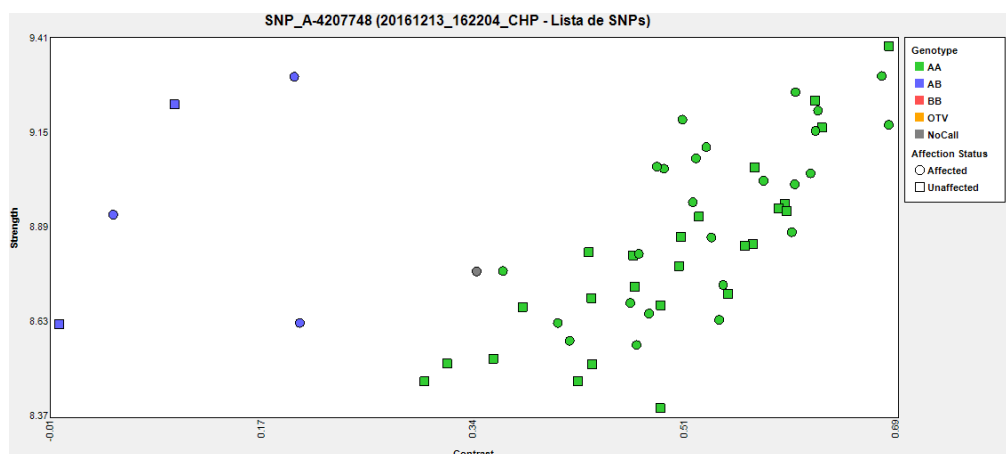
APÊNDICE B

Gráfico 3 – SNP com alta probabilidade de associação.



Legenda: Associação do genótipo com o fenótipo do SNP com alta probabilidade de associação. Na ordenada observa-se os valores da força e, na abscissa os valores do contraste. Ambos, representam os parâmetros da leitura da fluorescência da ligação do DNA na sonda do chip.

Gráfico 4 – SNP com baixa probabilidade de associação.



Legenda: Associação do genótipo com o fenótipo do SNP com baixa probabilidade de associação. Na ordenada observa-se os valores da força e, na abscissa os valores do contraste. Ambos, representam os parâmetros da leitura da fluorescência da ligação do DNA na sonda do chip.